

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie,  
Campus Virchow Klinikum der Charité, Humboldt Universität Berlin und

Deutsches Herzzentrum Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. Eckart Fleck

## HABILITATIONSSCHRIFT

# **Die Bedeutung entzündlicher Reaktionen für die Pathogenese der Arteriosklerose – Untersuchungen an einem *in vitro* Modell menschlicher kardialer Endothelzellen**

zur Erlangung der *venia legendi*

Der Medizinischen Fakultät

Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

Dr. med. Michael Gräfe

Prof. Dr. med. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Zeiher, Frankfurt/Main  
2. Prof. Dr. Markus Hecker, Göttingen

eingereicht: 01. 08 2000

Datum der Habilitation: 17. 07. 2001

---

## **Kurzfassung:**

Während die zellulären Mechanismen der Pathogenese der Arteriosklerose intensiv untersucht worden sind, ist über die Mechanismen, die zu einer bevorzugten Lokalisation arteriosklerotischer Läsionen in bestimmten Gefäßbereichen führen, weniger bekannt. Zur Untersuchung dieser Mechanismen wurden Endothelzellen aus menschlichen Koronararterien, einem Gefäßbereich, in dem häufig arteriosklerotische Läsionen beobachtet werden, isoliert und kultiviert. Endothelzellen der Mikrozirkulation menschlicher Herzen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und die Reaktionen beider Zellarten verglichen. Inkubation der Zellen mit den in Bezug auf die Bildung arteriosklerotischer Plaques besonders pathogenen oxidierten LDL induzierte in makrovaskulären koronaren Endothelzellen eine stärkere Zunahme der PAI-1 Aktivität (182%,  $p < 0,05$ ) als in mikrovaskuläre Zellen (144%,  $p < 0,05$ ) während nicht oxidierte n-LDL die sezernierte PAI-1 Aktivität nicht beeinflussten. Nach Stimulation mit Angiotensin II ( $10^{-11} - 10^{-5}$  M) zeigte sich auf makrovaskulären koronaren Endothelzellen eine stärkere Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selectin als auf mikrovaskulären Endothelzellen. Die Angiotensin II induzierte E-Selectin Expression führte in vitro auch funktionell zu einer erhöhten Adhäsion von HL60 Zellen unter Flußbedingungen. Dagegen wurde die für die Leukozytenrekrutierung im Rahmen inflammatorischer Reaktionen wichtige L-Selectin abhängige Adhäsion von Angiotensin II nicht induziert. Stimulation mit TNF $\alpha$  führte überwiegend an mikrovaskulären Endothelzellen zum Auftreten einer L-Selectin abhängigen Adhäsion. Die unterschiedliche Reaktion mikro- und makrovaskulärer kardialer Endothelzellen bietet eine Möglichkeit, zellspezifische Differenzierung und preferentielle Lokalisation arteriosklerotischer Läsionen in makrovaskulären Gefäßbereichen einerseits und das Auftreten entzündlicher Reaktionen im Bereich der Mikrozirkulation andererseits zu erklären.

Schlüsselwörter: Endothelzellen, E-Selectin, L-Selectin, oxidierte LDL.

---

## Abstract

While the cellular mechanisms of atherosclerosis have been intensively studied, the mechanisms leading to preferential localization of atherosclerotic lesions are less well understood. To further define these mechanisms, endothelial cells from coronary arteries, i.e. vessels with frequent atherosclerotic lesions, were isolated and grown in vitro. In order to compare the reactions of both cell types, endothelial cells derived from microvessels of human hearts were isolated and cultured under identical conditions. Incubation of endothelial cells with oxidized LDL (75 µg/ml protein) induced a significant increase in PAI-1 activity (182 %,  $p < 0.05$ ) in coronary macrovascular endothelial cells. This stimulatory effect of ox-LDL was less significant in microvascular endothelial cells (144%,  $p < 0.05$ ). n-LDL did not influence secreted PAI-1 activity. Stimulation with angiotensin II induced expression of E-selectin more effectively in coronary macrovascular than in microvascular endothelial cells. In addition, angiotensin II-induced E-selectin expression led to increased E-selectin-dependent adhesion of HL60 cells to coronary macrovascular endothelial cells under flow conditions, while only little effects were observed with cardiac microvascular endothelial cells. In contrast, L-selectin-dependent adhesion, which has been shown to play an important role in inflammatory reactions, was preferentially observed in cardiac microvascular endothelial cells and could only be stimulated with  $\text{TNF}\alpha$ , not by angiotensin II. Therefore, these cellular differences may in part explain specific properties of cardiac endothelial cells: Such that atherosclerotic lesions are localized in macrovascular vessel segments, whereas inflammatory responses are predominantly found in the microvasculature.

Keywords: endothelial cells, E-Selectin, L-Selectin, oxidized LDL.

1	Zusammenfassung	1
2	Isolierung und Charakterisierung humaner kardialer makrovaskulärer und mikrovaskulärer Endothelzellen	11
2.1	Einleitung	11
2.2	Ergebnisse	15
2.2.1	Histologische Untersuchung von menschlichem Myokardgewebe:	15
2.2.2	Isolierung mikrovaskulärer Endothelzellen:	16
2.2.3	Isolation makrovaskulärer Endothelzellen aus Koronararterien:	18
2.2.4	Beurteilung der isolierten Zellen	18
2.2.5	Zelltrennung mit paramagnetischen Dynabeads	20
2.3	Diskussion der Ergebnisse	23
3	Wirkungen von normalen und oxidiertem LDL auf mikro- und makrovaskuläre kardiale Endothelzellen	30
3.1	Einleitung	30
3.2	Ergebnisse	32
3.2.1	Isolierung und Charakterisierung der LDL	32
3.2.2	Wirkungen der LDL Fraktionen auf die t-PA-Sekretion mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen	38
3.2.3	Wirkungen der LDL Fraktionen auf die PAI-1 Aktivität und PAI-1 Sekretion mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen	39
3.2.4	Wirkungen der LDL Fraktionen auf die prokoagulante Aktivität (PKA) mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen	42
3.2.5	Wirkungen der LDL Fraktionen auf die Angiotensin Converting Emzyme Aktivität (ACE) mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen	44
3.3	Diskussion der Ergebnisse	46
4	Untersuchungen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und der Adhäsion von Leukozyten auf kardialen Endothelzellen	51
4.1	Einleitung	51
4.2	Ergebnisse	54
4.2.1	Charakterisierung der Expression von Adhäsionsmolekülen und ihrer mRNA in kardialen Endothelzellen	54
4.2.2	Charakterisierung der Adhäsion von HL60 Zellen an kardialen Endothelzellen	68



4.3	Diskussion der Ergebnisse	75
5	Charakterisierung der L-Selectin abhängigen Adhäsion an kardialen mikrovaskulären Endothelzellen	82
5.1	Einleitung	82
5.2	Ergebnisse	84
5.2.1	Adhäsion von NALM6-L Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$	84
5.2.2	Adhäsion von NALM6-L Zellen nach Stimulation mit CD40 Ligand	87
5.2.3	Untersuchungen zur Wirkung von Neuraminidase	87
5.2.4	Untersuchungen zur Wirkung von O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase und Tunicamycin	90
5.2.5	Untersuchungen zur Wirkung von Cycloheximid und Trypsin	93
5.2.6	Untersuchungen zur Wirkung von Heparinasen	95
5.3	Diskussion	97
6	Material und Methoden	102
6.1	Isolierung humaner kardialer mikrovaskulärer Endothelzellen (HMCEC)	102
6.1.1	Präparation	102
6.2	Isolierung humaner kardialer makrovaskulärer Endothelzellen (CEC)	105
6.2.1	Präparation	105
6.3	Anreicherung von humanen Endothelzellkulturen	106
6.4	Charakterisierung von humanen Endothelzellen	107
6.5	Immunhistologie	109
6.6	Isolierung von Low Density Lipoproteinen (LDL)	110
6.6.1	LDL Präparation	110
6.6.2	LDL Charakterisierung	111
6.6.3	Normale LDL (n-LDL)	112
6.6.4	LDL Modifizierung	112
6.6.5	Nachweis der Modifizierung der LDL	113
6.7	Endotoxinnachweis	114
6.8	Messung von Gewebeplasminogen Aktivator (t-PA)	115
6.9	Messung von Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) Aktivität	117

6.10	Messung der Sekretion von Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) Antigen	117
6.11	Messung der Prokoagulanten Aktivität (PKA)	118
6.12	Messung der Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Aktivität aus Zellkulturüberständen von HMCEC und HCEC	119
6.13	Adhäsionsassay	120
6.13.1	Aufbau der Flußkammer	120
6.13.2	Durchführung des Adhäsionsassays	121
6.13.3	Verwendete Leukozyten	123
6.13.4	Behandlung der Zellen für Adhäsionsassay	124
6.14	Zell-ELISA	125
6.15	RT-Polymerase Kettenreaktion (PCR)	125
6.16	Statistische Auswertung der Ergebnisse	127
7	7. Literaturverzeichnis	128
8	Danksagung	151

## 1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren sind bedeutende Fortschritte im Verständnis der Pathogenese der Arteriosklerose gemacht worden. Die kardiovaskulären Erkrankungen als Manifestation der Arteriosklerose sind unverändert Ursache für über 50% der Todesfälle in den westlichen Ländern ([165](#)). Nach dem 75. Lebensjahr sind sie sogar für ca. 70% der Todesursachen verantwortlich.

Die Arteriosklerose ist eine Erkrankung, die aus einem komplexen Interagieren molekularer und zellulärer Veränderungen in der Intima der Arterien beginnt und durch ein Zusammenspiel genetischer und umweltbedingter Faktoren (Hyperlipidämie, Hypertonie, Zigarettenrauchen) moduliert wird. Diese Interaktionen implizieren aber zugleich, daß Faktoren auf der Ebene der Gefäßwand und der einzelnen Zelle spezifisch die Empfindlichkeit gegenüber den Risikofaktoren modifizieren und so den Verlauf und den Phänotyp der Arteriosklerose beeinflussen.

Durch die Entwicklung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen zelluläre Komponenten der Gefäßwand und gegen Plasmafraktionen, durch Tiermodelle und durch neue molekularbiologische Techniken, konnten wichtige Faktoren in der Ätiologie der Arteriosklerose identifiziert werden. Da einzelne dieser identifizierten Faktoren in einem komplexen *in vivo* System schlecht untersucht werden können, bietet sich als Alternative an, diese Untersuchungen in *in vitro* Modellen unter gut definierten Bedingungen durchzuführen.

Trotz der Einführung von Tiermodellen zum Studium der Arteriosklerose ([185](#), [256](#)) ist es aufgrund der Speziesunterschiede notwendig, die Mechanismen der Arterioskleroseentstehung auch in einem menschlichen Modell zu studieren. Dies ist naturgemäß *in vivo* nur eingeschränkt möglich.

*In vitro* Modelle mit vaskulären Zellen bieten sich als Alternative an, um die in der Patho-

genese der Arteriosklerose wichtigen Mechanismen und zellulären Interaktionen zu untersuchen. Diese Modelle haben den Vorteil, daß die Versuche mit humanem Gewebe durchgeführt werden können und - falls es gelänge aus bestimmten Abschnitten der Zirkulation Zellen zu isolieren - auch organspezifische Eigenheiten zu definieren. Für das Organ Herz existieren diese Modelle nicht.

Endothelzellen sind an den frühen Stadien der Atherogenese entscheidend beteiligt, da sie durch vielfältige Funktionen die lokale Homöostase der Gefäßwand aufrecht erhalten. Sie wirken nicht nur regulierend auf den Gefäßtonus und die lokale Koagulation ein, sondern sind ganz wesentlich an der Monozyten- und Lymphozytenrekrutierung, die die frühen arteriosklerotischen Läsionen kennzeichnet, beteiligt.

Zielsetzung war es daher, aus der kardialen Zirkulation ein Modell menschlicher kultivierter Endothelzellen zu etablieren, das eine genügende Anzahl und Reinheit der isolierten Zellen garantiert, um Versuche unter möglichst physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.

Diese Zielsetzung konnte durch die Etablierung von Methoden realisiert werden, mit denen aus menschlichen Koronararterien Endothelzellen isoliert und in Kultur vermehrt wurden. Um ein Vergleichssystem aus einem Bereich der kardialen Zirkulation zur Verfügung zu haben, in der die typischen arteriosklerotischen Veränderungen nicht auftreten, wurden zusätzlich aus Herzmuskelgewebestücken Endothelzellen der Mikrozirkulation gewonnen. Die für die Isolation der Endothelzellen benötigten Koronararterien und Herzmuskelgewebestücke wurden bei Herztransplantationen aus explantierten Herzen gewonnen. Für die Untersuchungen wurden Herzen von Patienten, die an einer Kardiomyopathie oder einer Klappenerkrankung erkrankt waren sowie Patienten mit angeborenen Herzfehlern verwendet. Dies sollte arteriosklerotisch bedingte zelluläre Veränderungen ausschließen. Da die morphologischen und funktionellen Eigenschaften der kardialen Endothelzellen nicht bekannt waren, mußte neben der reinen zahlenmäßigen Isolation der Zellen auch eine Charakterisierung erfolgen.

Durch Verwendung bekannter endothelialer Marker, wie von Willebrandt Faktor und CD31, konnten die isolierten Zellen als Endothelzellen identifiziert werden. Die primär isolierten Kulturen zeigten jedoch eine Verunreinigung mit nicht-endothelialen Zellen, so daß zusätzlich auch Methoden zur Reinigung von nicht-endothelialen Zellen entwickelt werden mußten.

Die bislang von anderen Autoren für Zellen verwendeten Trennmethode waren wegen ihrer schlechten Diskriminationsfähigkeit oder geringen Leistungsfähigkeit nicht anwendbar. Durch die Verwendung paramagnetischer Dynabeads, die mit Proteinen gekoppelt werden können, war es möglich, die isolierten Mischkulturen mit hoher Effizienz und Reinheit zu trennen. Dazu wurden paramagnetische Dynabeads mit dem Lectin Ulex Europaeus gekoppelt. Diese Dynabeads lagern sich spezifisch an Endothelzellen an und können in einem Magnetfeld zusammen mit den Endothelzellen gesammelt werden. Die Kulturen zeigten nach dieser Trennprozedur und Färbung mit Endothelmarkern, wie z.B. CD31, und anschließender Analyse im Durchflußzytometer eine Reinheit von > 95% Endothelzellen, so daß die gewonnenen Zellkulturen für die geplanten Untersuchungen gut geeignet erschienen ([87](#)).

Die isolierten Zellen aus Koronararterien und der kardialen Mikrozirkulation wurden unter identischen Kulturbedingungen kultiviert, um für Untersuchungen vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen. Da die Isolationsprozedur eine hohe Ausbeute von Zellen und hoch reine Kulturen gewährleistete, konnten Untersuchungen mit diesen Zellen zu frühen Kulturzeitpunkten durchgeführt werden, ehe - durch exzessive Zellteilungen und lange Kulturdauer - eine Alterung und Dedifferenzierung der Zellen auftrat. Die Charakterisierung und Isolierung der kardialen Endothelzellen ist in Abschnitt 2 dargestellt.

Dieses *in vitro* Modell kultivierter menschlicher kardialer Endothelzellen konnte nun zur Untersuchung zellulärer und molekularer Mechanismen der Pathogenese der Arteriosklerose verwendet werden. Dabei war ein Schwerpunkt der Vergleich zellulärer Funktion von Endothelzellen aus der Mikro- und der Makrozirkulation, zwei Gefäßarealen, die unterschiedlich die Veränderungen der arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen spiegeln. Arteriosklerotische Plaques werden in den großen Gefäßen (Aorta, Arteria Carotis, Arteria femoralis) beobachtet ([71](#)), dagegen nicht in der Mikrozirkulation. Die Veränderungen der Mikrozirkulation spiegeln sich lediglich in funktionellen Veränderungen wieder, die wesentlich durch die Risikofaktoren der Arteriosklerose wie arterielle Hypertonie ([117](#), [126](#)) und Hypercholesterinämie ([44](#)), aber auch durch einen Diabetes mellitus ([184](#)), beeinflußt werden.

Die Reaktion mikro- und makrovaskulärer kardialer Endothelzellen auf Lipoproteine wurde

bestimmt, um ein zelluläres Korrelat für die unterschiedliche Reagibilität der kardialen Gefäßregionen zu finden. Dabei läßt sich nutzen, daß subendotheliale Einlagerung von Lipoproteinen in der Arterienwand durch das Auftreten oxidativ veränderter LDL gekennzeichnet sind ([266](#)).

Um die Effekte oxidiertter LDL an kardialen Endothelzellen zu studieren, wurden normale und oxidierte low density Lipoproteine (ox-LDL) mit Endothelzellen der kardialen Mikro- und Makrozirkulation inkubiert und die Veränderungen verschiedener koagulatorischer Endothelzellfunktionen untersucht. Während normale LDL keine signifikanten Wirkungen induzierte, verursachte oxidiertes LDL an makrovaskulären koronaren Endothelzellen eine verminderte Sekretion des Gewebe-Plasminogen-Aktivators (t-PA) und einen Anstieg der Sekretion des Plasminogen Aktivator Inhibitors 1 (PAI-1) und der Gewebefaktorbildung, der als ein wichtiger Aktivator der extrinsischen Gerinnungsaktivierung angesehen wird ([88](#)). Erstaunlicherweise reagierten mikrovaskuläre Endothelzellen, trotz identischer Kulturbedingungen, nur mit geringen Änderungen der gemessenen Parameter, so daß eine gefäßbettspezifische Reaktionsweise der Endothelzellen aus der kardialen Zirkulation zutage trat. Dieses unterschiedliche Verhalten mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen ist möglicherweise ein Faktor, der die präferentielle Lokalisation arteriosklerotischer Plaques in den großen Gefäßen mit bedingt. Auf der anderen Seite zeigt die unterschiedliche Reaktion der Zellen, daß mit den etablierten Isolations- und Trennmethode in der Tat unterschiedliche Zellpopulationen gewonnen werden konnten (siehe Abschnitt 3).

Neben den Interaktionen zwischen Lipoproteinen und kardialen Endothelzellen wurden auch die Wechselwirkungen der kardialen Endothelzellen mit Entzündungsmediatoren (Zytokinen) und Leukozyten untersucht, da in den letzten Jahren die Wichtigkeit der im Bereich arteriosklerotischer Plaques zu beobachtenden Entzündungsreaktionen zunehmend erkannt worden ist ([164](#), [201](#)). Ein Verständnis der Vorgänge, die die Leukozytenadhäsion regulieren, würde auch neue Ansätze in der Therapie der Arteriosklerose ermöglichen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion zwischen Leukozyten und kardialen Endothelzellen konnte beobachtet werden, daß makrovaskuläre koronare Endothelzellen besonders empfindlich für aktivierende Stimuli, z.B. proinflammatorische Zytokine, reagieren. Bei diesen Versuchen zeigte sich außerdem, daß Angiotensin II, das sowohl auf den

Gefäßtonus regulierend (78) wirkt, als auch trophische Wirkungen auf glatte Muskelzellen (76) und Fibroblasten (170) hat, die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selectin sowie E-Selectin abhängige Adhäsion auf makrovaskulären Endothelzellen induzierte. Auch hier reagierten mikrovaskuläre Endothelzellen nur mit einem leichten Anstieg der E-Selectin Expression, eine vermehrte Adhäsion ließ sich nicht nachweisen. Durch spezifische Rezeptorblocker konnte der Rezeptor, der die Wirkungen des Angiotensin II auf die E-Selectin Expression vermittelt, identifiziert werden: Angiotensin II Typ 1 Rezeptoren. Diese Ergebnisse demonstrierten einen bisher unbekannten proinflammatorischen Effekt des Angiotensin II auf Endothelzellen und zeigten zum ersten Mal eine Verbindung zwischen dem Renin-Angiotensin-System und Leukozyten-Endothel-Interaktionen auf (89).

Andere Autoren haben inzwischen stimulatorische Wirkungen des Angiotensin II auch auf die Expression anderer Adhäsionsmoleküle (195) und auf die Sekretion von Chemokinen (45) gezeigt und damit die Bedeutung dieser proinflammatorischen Effekte des Angiotensin II für die Pathogenese der Arteriosklerose unterstrichen. Letztlich können auch die positiven Wirkungen der ACE-Hemmer und der AT1-Rezeptorblocker auf die Mortalität und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, die wiederholt in großen Studien gezeigt wurden (189, 268), mit den Wirkungen des Angiotensin II auf zelluläre Funktionen erklärt werden, indem diese Medikamente zu einer verminderten inflammatorischen Wirksamkeit des Angiotensin II führten.

Neben humoralen Faktoren wie Zytokinen und Angiotensin II können jedoch auch zelluläre Komponenten eine Entzündungsreaktion induzieren. CD40-Ligand (CD154) ist ein TNF ähnliches Protein, das auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Lymphozyten (84) und - wie kürzlich gezeigt werden konnte – auch von aktivierten Thrombozyten exprimiert wird (104).

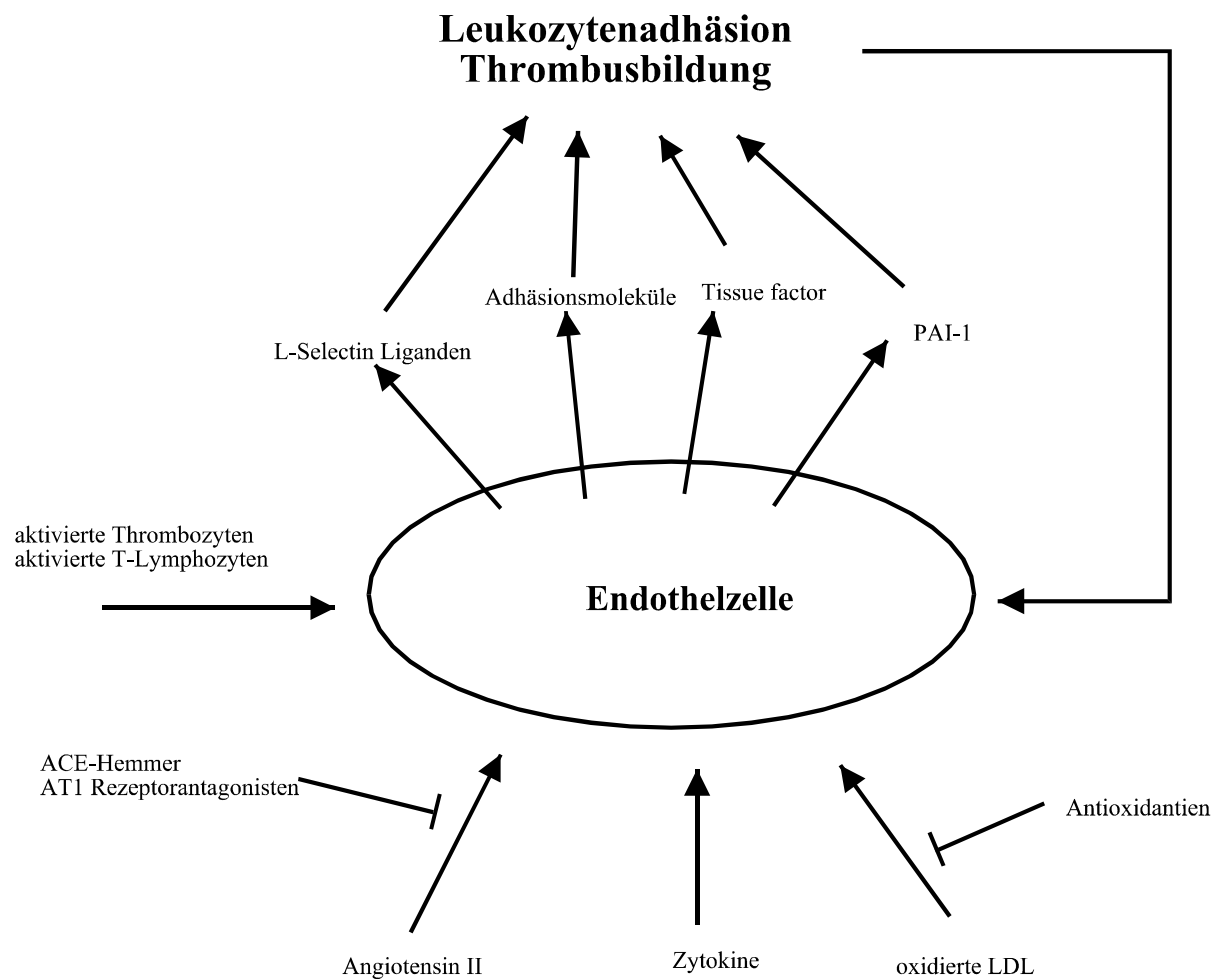
Wie die hier durchgeführten Versuche zur Wirkung von CD40-Ligand auf vaskuläre Endothelzellen belegen, induzierte CD40 Ligand auf Endothelzellen sowohl eine Expression von Adhäsionsmolekülen als auch eine vermehrte Leukozytenadhäsion. Die Effekte durch CD40 Stimulation waren im Vergleich zu TNF $\alpha$  etwas schwächer ausgeprägt aber qualitativ ähnlich. Da der aktive CD40 Ligand nur auf der Zelloberfläche aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und aktivierter Thrombozyten zu finden ist, bleiben die Wirkungen lokal begrenzt. Sie

stellen aber einen zusätzlichen Entzündungsstimulus dar, der – wie inzwischen von anderen Autoren gezeigt worden ist ([111](#), [134](#)) - für entzündliche Erkrankungen durchaus von Bedeutung sein kann und somit auch für die Pathogenese der Arteriosklerose.

Neben der gefäßbettabhängigen unterschiedlichen Induktion der E-Selectin abhängigen Leukozytenadhäsion konnten auch Unterschiede der L-Selectin abhängigen Interaktionen zwischen Leukozyten und kardialen Endothelzellen beobachtet werden. So zeigte sich, daß L-Selectin abhängige Adhäsion vorzugsweise an Endothelzellen aus der kardialen Mikrozirkulation auftrat und an makrovaskulären koronaren Endothelzellen kaum zu beobachten war. Kultivierte mikrovaskuläre Endothelzellen sind damit eines der wenigen *in vitro* Modelle mit Zellen humanen Ursprungs, mit dem L-Selectin abhängige Adhäsion an spezifische L-Selectin Liganden beobachtet werden kann. Eine Charakterisierung des L-Selectin Liganden ergab, daß er sich von anderen bekannten Liganden auf hochendothelialen Venolen des Lymphsystems ([135](#), [208](#)) in seiner Regulation und seinen Zuckerkomponenten unterscheidet und möglicherweise eine Proteoglykan ist.

Aus diesen Ergebnissen könnte spekuliert werden, daß Angiotensin II und CD40 vor allem in frühen Stadien der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen eine Bedeutung als proinflammatorische Leukozytenadhäsion-induzierende Faktoren haben, während L-Selectin in späteren Stadien, wenn sich bereits eine Neovaskularisation im Bereich des Plaques ausgebildet hat ([14](#), [271](#)), für die Leukozytenrekrutierung von Bedeutung ist.





**Abbildung 1.1:** Interaktionen von Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten und ihre Modulation durch Zytokine, Angiotensin II und oxidierte LDL bei der Pathogenese der Arteriosklerose

Das Modell kultivierter kardialer menschlicher Endothelzellen ermöglichte es, zelluläre Funktionen, die in der Pathogenese der Arteriosklerose von Bedeutung sind, zu untersuchen und dabei regionale Unterschiede sowohl koagulatorischer Funktionen als auch Funktionen, die für die Leukozytenrekrutierung von Bedeutung sind, zu identifizieren und so zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen der Arteriosklerose beizutragen. Die Untersuchungen zeigten weiter, daß sich auch für die Therapie ein neues Verständnis ergeben könnte.

Der Wirkungen oxidiertes LDL kann eine Ratio für das Einsetzen von Antioxidantien in die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen. Für Probucol gibt es neben zahlreichen Untersuchungen an Tiermodellen ([43](#), [254](#)) auch Studien, die die Wirksamkeit bei koronarer Herzerkrankung am Menschen belegen ([199](#), [232](#)). Für andere Antioxidantien, wie z.B. Vitamin-E, Vitamin C und  $\beta$ -Caroten, liegen jedoch noch keine einheitlichen Ergebnisse vor ([105](#), [186](#), [226](#)), so daß ein Therapiekonzept noch nicht abgeleitet werden kann.

Eine Therapie mit ACE-Hemmern oder AT1 Rezeptorblockern, die lokal die Verfügbarkeit bzw. die Wirksamkeit des Angiotensin II vermindern, könnte - aufgrund der hier dargelegten Ergebnisse - nicht nur als eine antihypertensive Therapie, sondern auch als eine antiinflammatorische und damit antiarteriosklerotische Therapie verstanden werden und einen Teil der positiven Wirkungen erklären, die in verschiedenen großen Studien für diese Medikamente gezeigt worden sind.

L-Selectin spielt neben der Rezirkulation von Leukozyten ([35](#)) auch bei Reperfusionsschäden des Myokards ([34](#)) eine Rolle. Möglicherweise ist auch die Leukozytenakkumulation in arteriosklerotischen Plaques L-Selectin abhängig, was aufgrund der fehlenden Detektionsmöglichkeiten bisher nicht bewiesen werden konnte. Neue Techniken der *in vivo* Markierung von biologischen Molekülen eröffnet die Möglichkeit, diese fehlenden Informationen zu ergänzen ([60](#)), um dann durch selektive Inhibition von L-Selectin abhängigen ([168](#)) Adhäsionsmechanismen Reperfusionsschäden bei Myokardinfarkten und die Leukozytenrekrutierung in die Gefäßwand zu hemmen.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen an einem neu entwickelten *in vitro* Modell humaner

menschlicher kardialer Endothelzellen unterschiedliche Reaktionen der Zellen aus Koronararterien und aus der kardialen Mikrozirkulation. Durch die differentielle Untersuchung mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen in ihrer Reaktion auf oxidierte Lipoproteine und verschiedene Entzündungsmediatoren war es möglich, mehrere Endothelzellfunktionen zu definieren, die in beiden Zellarten unterschiedlich reguliert werden. Diese unterschiedlichen zellulären Reaktionen können in den frühen Stadien der Arteriosklerose für die Progression der Erkrankung von Bedeutung sein und ermöglichen es, die Pathogenese der Arteriosklerose auf zellulärer Ebene differenzierter zu betrachten.



## **2 Isolierung und Charakterisierung humaner kardialer makrovaskulärer und mikrovaskulärer Endothelzellen**

### **2.1 Einleitung**

Das Verständnis der Pathogenese der Arteriosklerose ist in den letzten 20 Jahren revolutioniert worden. Wesentlich für das moderne Verständnis dieser chronischen Erkrankung haben die Arbeiten von R. Ross beigetragen, der in den 70er Jahren die „Response to injury“ Hypothese formulierte ([202](#)). Diese Hypothese besagte, daß es an bestimmten Stellen des Gefäßbettes zu einem Verlust des Gefäßendothels käme und dieses der Ausgangspunkt für Thrombozytenaggreagte darstellen würde, die wiederum durch Freigabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF, eine Kaskade von Ereignissen triggerten, die letztendlich in der arteriosklerotischen Läsion endeten ([99](#), [204](#)). Im Laufe der Jahre wurde diese Hypothese modifiziert und den neuen Erkenntnissen angepaßt, ist aber in ihrem grundlegenden Gedanken auch heute noch gültig ([201](#)). Zunächst stand die Reaktion der glatten Muskelzellen im Vordergrund der Forschung ([203](#)). Durch die Entdeckung der Adhäsionsmoleküle erweiterte sich der Blickpunkt auf die Endothelzellen ([190](#)). Da Adhäsionsmoleküle die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel vermitteln, lag es nahe zu vermuten, daß das Einwandern von Makrophagen und Lymphozyten ([98](#)) in die Gefäßwand im Bereich von Cholesterineinlagerungen durch endotheliale Adhäsionsmoleküle gesteuert würde. Diese Hypothese konnte durch den Nachweis von vermehrt expremierten Adhäsionsmolekülen und einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten im Bereich arteriosklerotischer Läsionen gestützt werden ([58](#), [179](#), [245](#)). Die zur Zeit allgemein vertretene Auffassung besagt, daß die frühen Stadien der Arteriosklerose einem entzündungsähnlichen Prozeß gleichen, der durch die Einlagerung von Lipoproteinen in die Gefäßwand induziert wird und zunächst als ein reparativer Prozeß verstanden werden kann, der jedoch, wenn er überhand nimmt und chronisch bleibt, zu einer Zerstörung des Organs „Gefäß“ führt ([201](#)).

Einen wesentlichen Anteil an den modernen Erkenntnissen der Arteriosklerose haben Tiermodelle beigetragen, die es ermöglichten, die arteriosklerotischen Veränderungen im Kontext der regulativen Prozesse des gesamten Körpers zu studieren. Leider sind die aus diesen Modellen gewonnen Erkenntnisse nur beschränkt auf den Menschen übertragbar, da die arteriosklerotischen Läsionen der Tiermodelle den im menschlichen Organismus vorkommenden nur ähneln und damit nur Teilaspekte darstellen können (29). Dies führte dazu, für Studien der Arterioskleroseentstehung menschenähnliche Primaten, Affen, zu verwenden (145, 155). Auf der anderen Seite war man bemüht, neue und bessere Tiermodelle zu entwickeln (LDL-Rezeptor deficient mice, ApoE deficient mice), die die Veränderungen der menschlichen Arteriosklerose besser nachbilden (114, 185).

Als weitere Möglichkeit die Mechanismen der Arterioskleroseentstehung zu studieren, bieten sich *in vitro* Versuche mit menschlichen Zellkulturen an, die den Vorteil haben, die Reaktionsweisen spezifischer Zellpopulationen unter definierten Bedingungen studieren zu können, allerdings außerhalb der physiologischen Umgebung des Körpers.

Techniken zur Isolation menschlicher Endothelzellen, glatter Muskelzellen und Monozyten sind vielfältig beschrieben worden. Als Modell werden meist aus Nabelschnüren gewonnene Zellen verwendet, da das Gewebe leicht zu beschaffen ist, und sich die Zellen einfach isolieren lassen (68, 115). Vielfältige Befunde zeigen jedoch, daß Morphologie und Funktion der Gefäßzellen regional unterschiedlich ist (77, 218). Daher muß die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die mit Zellen der Nabelschnur gewonnen wurden, auf andere Gefäß- und Organbereiche jeweils überprüft werden.

Idealerweise sollten für Untersuchungen zur koronaren Herzerkrankung Zellen aus Koronararterien verwendet werden. Da bei Herztransplantationen Koronararterien zur Verfügung stehen, bietet sich die Möglichkeit an, aus diesen Gefäßen Endothelzellen zu isolieren und diese für *in vitro* Versuche zu isolieren und zu kultivieren.

Derartige Modelle waren für menschliche Koronararterien nicht bekannt und mußten daher neu etabliert werden. Dies betraf nicht nur die Isolationstechnik aus den Koronararterien, sondern auch die nachfolgende Kultivierung, Zellvermehrung und Reinigung von nicht-endothelialen Zellen.

Um die für die Entstehung der Arteriosklerose typischen Eigenschaften der koronaren Endothelzellen erkennen zu können, ist ein zelluläres Vergleichssystem notwendig, das ebenfalls aus dem menschlichen Herzen stammen sollte, um den Vergleich nicht durch spezifische Eigenschaften anderer Organe zu komplizieren. Für diesen Zweck bietet es sich an, Zellen aus der Mikrozirkulation menschlicher Herzen zu isolieren. Diese Zellen würden aus dem gleichen Organ stammen, aus dem die koronaren Zellen isoliert werden, aber aus einem anderen Gefäßbereich, in dem die typischen arteriosklerotischen Veränderungen der großen Arterien nicht beobachtet werden.

Vergleichbar wie für die Isolation makrovaskulärer Endothelzellen, gab es für die Isolation kardialer mikrovaskulärer Endothelzellen kaum publizierte Erfahrungen. Die Isolation kardialer Endothelzellen wurde aus Kaninchen ([216](#)), Meerschweinchen ([167](#)) und Rindern ([157](#)) beschrieben. Die Methoden gingen von anderen Voraussetzungen aus, was die Verarbeitung des Herzmuskels und die Vorbereitung der Versuchstiere betraf. Diese publizierten Methoden waren aber der Ausgangspunkt für die zu entwickelnden Methoden zur Isolierung humaner kardialer mikrovaskuläre Endothelzellen.

Zur Etablierung eines Modells kultivierter menschlicher Endothelzellen aus Koronararterien und aus der kardialen Mikrozirkulation mußte die Technik der Isolierung der beiden Zellarten – entsprechend den spezifischen Gegebenheiten explantierter humaner Herzen – neu entwickelt werden. Ein Hauptproblem dabei war, die jeweils isolierten Zellen in ihren Eigenschaften von einander abzugrenzen und ihre Identität als mikro- bzw. makrovaskuläre Endothelzellen zu etablieren. Da sowohl die morphologischen als auch die funktionellen Eigenschaften humaner kardialer Endothelzellen nicht bekannt waren, war es zunächst notwendig, auf Grundlage der Isolationstechniken, die Zellen zu charakterisieren.

Hierfür sind Kulturen hoher Reinheit notwendig, die durch die bislang beschriebenen Isolationstechniken nicht zu gewährleisten waren. Neben der reinen Gewinnung der Zellen war es daher notwendig auch Methoden zur Trennung der isolierten Endothelzellen von nicht-endothelialen Zellen zu entwickeln.

In den folgenden Kapiteln wird die Isolation und morphologische Charakterisierung kardialer Endothelzellen dargestellt. In den Kapiteln 3 – 5 werden dann spezifische Zellfunktionen bei Interaktionen mit Lipoproteinen, Entzündungsmediatoren und Leukozyten beschrieben. Die hier gewonnenen Ergebnisse belegen, daß die aus menschlichen Herzen isolierten Endothel-

zellen zum Teil sehr gefäßbettspezifisch reagieren und so die unterschiedliche Herkunft der Zellen aus den verschiedenen Gefäßbereichen der kardialen Zirkulation belegen.



## 2.2 Ergebnisse

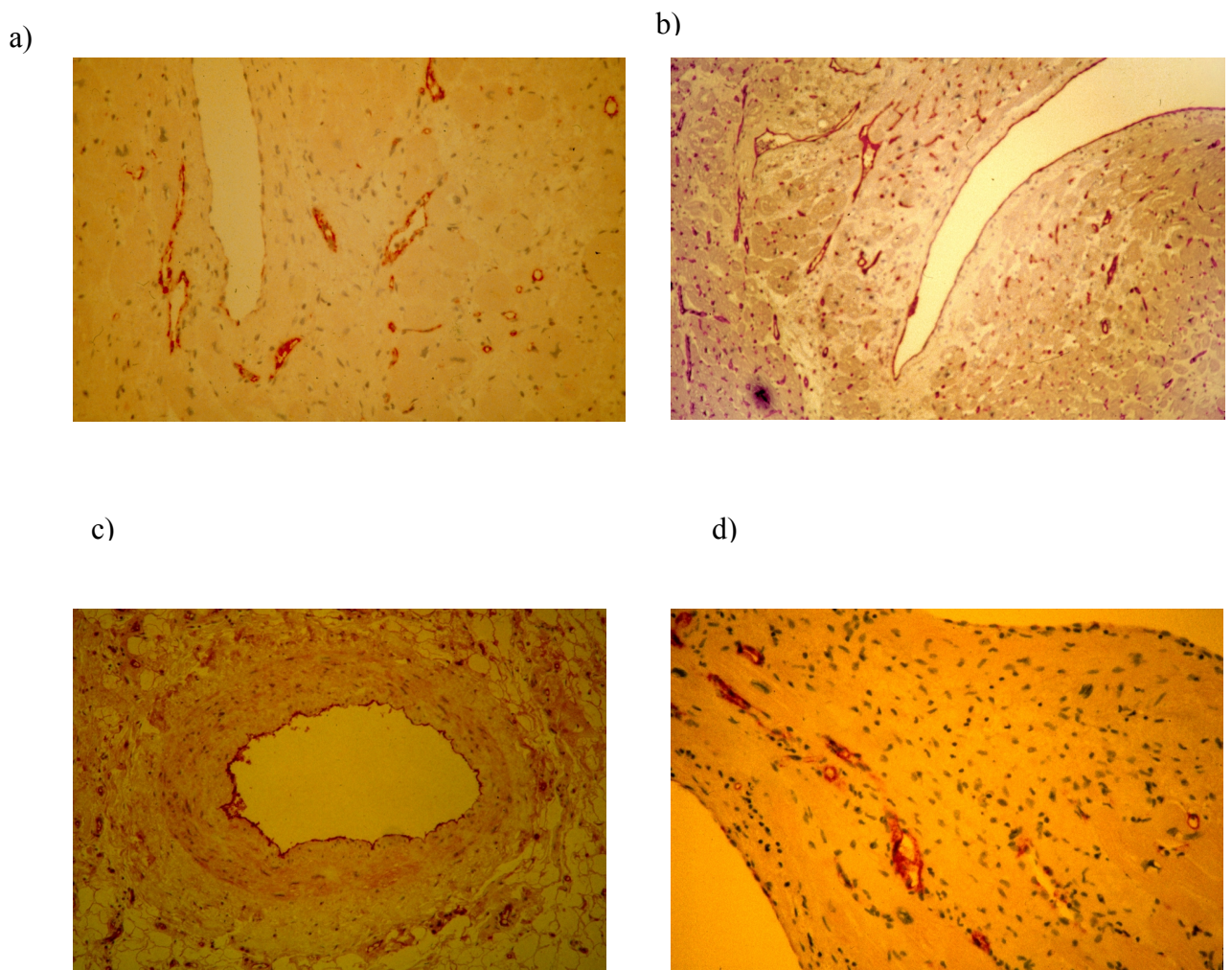
### 2.2.1 *Histologische Untersuchung von menschlichem Myokardgewebe:*

Es wurden zunächst histologische Untersuchungen an menschlichem Myokardgewebe vorgenommen, um verschiedene immunologische Charakteristika auf ihre Verwendung zur Identifikation und Charakterisierung der isolierten kardialen Endothelzellen zu überprüfen.

Ulex Europaeus färbte das Endothel der Arterien, Kapillaren und Venen an, aber auch das Epikard und das Endokard. Ein ähnliches Färbemuster wurde auch mit dem CD31 Antikörper beobachtet, der ebenfalls das Endothel von Arterien, Kapillaren, Venen sowie das Peri- und Endokard anfärbte. Antikörper gegen von Willebrand Faktor reagierten mit dem gesamten vaskulärem Endothel. Im Gegensatz zu CD31 und UEA-I wurde das Endokard jedoch nur sehr schwach und das Epikard überhaupt nicht gefärbt (Abbildung 2.1).

Die Färbung zum Nachweis alkalischer Phosphatase Aktivität zeigte eine positive Reaktion im Bereich der inneren Begrenzung kleiner Arterien, kleiner Venen und auch perikapillär. Große Gefäße, das Epi- und Endokard blieben dagegen negativ. Die histologischen Präparate erlaubten es jedoch nicht, die positive alkalische Phosphatase Reaktion einer bestimmten Zellart zu zuordnen (Siehe Seite 27).

Die Ergebnisse zeigten, daß Immunoreaktivität gegen UEA-I, CD31 und von Willebrandt Faktor auf menschlichen kardialen Endothelzellen nachweisbar ist. Von Willebrandt Faktor wird nur auf vaskulärem Endothel exprimiert und eignet sich daher am besten zur Identifizierung der isolierten Endothelzellen.

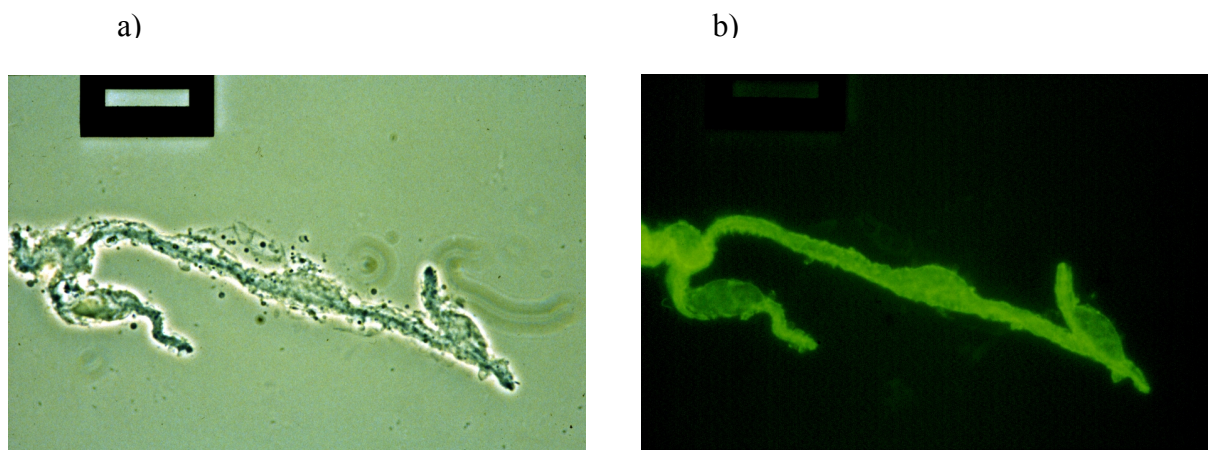


**Abbildung 2.1:** Histologische Präparate menschlichen Herzens wurden mit Antikörpern gegen von Willebrand Faktor (a), CD31 (b) gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Anfärbung mit dem Ulex Europaeus Lectin (c) und der alkalischen Phosphataseaktivität (d)

### **2.2.2 Isolierung mikrovaskulärer Endothelzellen:**

Während der Perfusion des Herzmuskelstücks mit Krebs-Henseleit Puffer konnten normalerweise Kontraktionen des Gewebes beobachtet werden, die unter der Perfusion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Krebs-Henseleit Puffer sistierten. Sie wurden als Indikator für eine gute

Perfusion der Mikrovaskulatur angesehen, die damit zugänglich für die im nächsten Schritt zugegebenen, abbauenden Enzyme war. Nach Beenden der 30 minütigen Perfusion mit Enzymen wurde das Muskelgewebe aufgeschnitten. Die mit Enzymen perfundierten Areale hoben sich von den nicht perfundierten durch Farbe und Konsistenz des Gewebes ab, das sich hell gefärbt und eine geleeartige Konsistenz annahm. Diese Anteile des Gewebes wurden erneut in der Enzymlösung inkubiert und die Desaggregation des Gewebes durch Entnahme von Aliquots beobachtet. Es zeigten sich perlschnurartige Gebilde, die bei Anfärbung mit FITC markiertem Ulex Europaeus Lectin, fluoreszierten. Diese perlschnurartigen Gebilde entsprachen Endothelzellverbänden, aus dem Gewebe herausgelösten Kapillarfragmenten (siehe Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2:** Ein bei der Isolierung mikrovaskulärer Endothelzellen gewonnenes Kapillarfragment. a) Phasenkontrastdarstellung. b) Färbung mit FITC Ulex Europaeus Lectin (Vergrößerung 1:100)

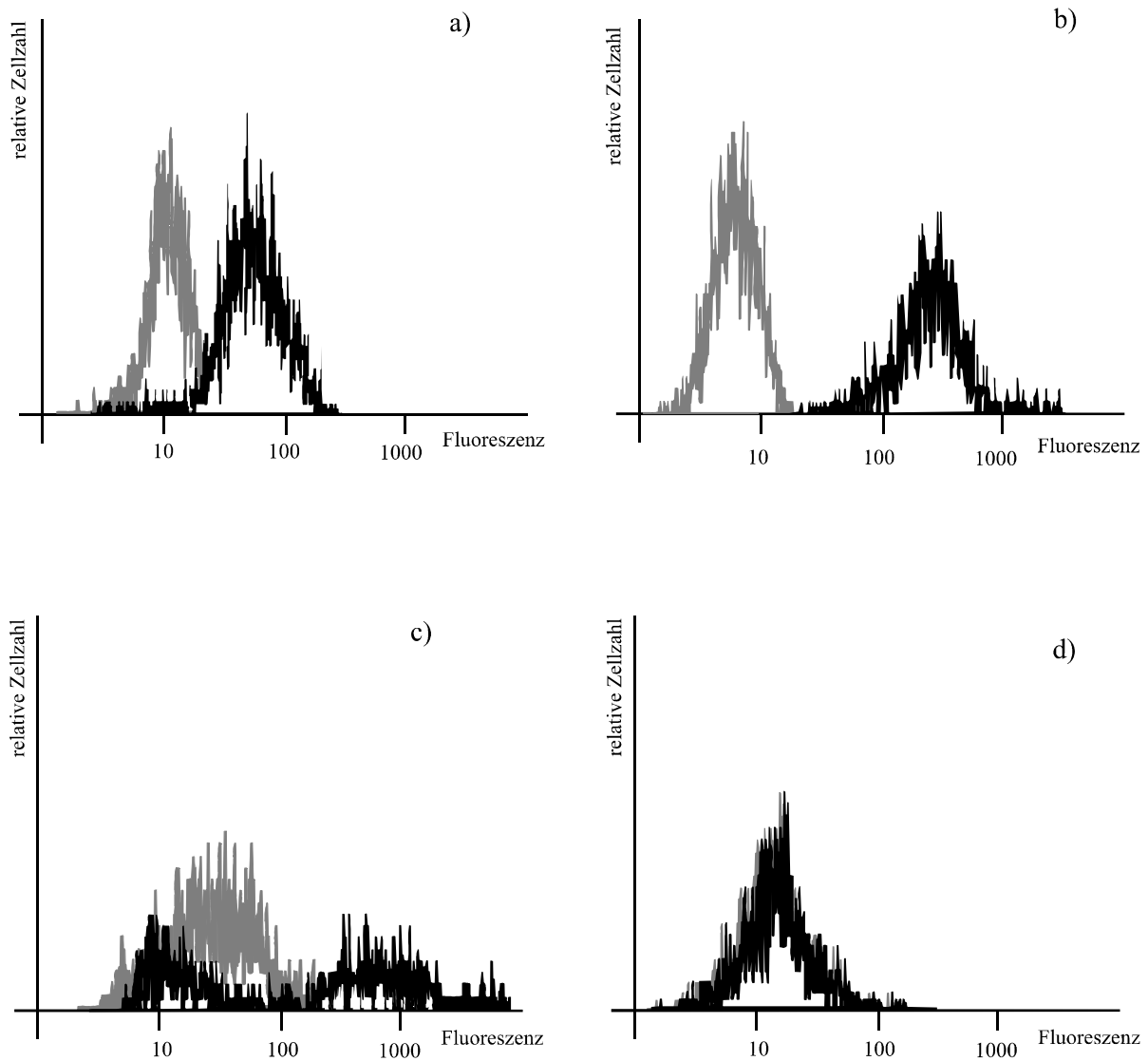
Nach Filtern durch ein Nygonsieb und Zentrifugieren der Zellsuspension wurde diese auf 300 cm<sup>2</sup> (4 T-75 Kulturflaschen) Wachstumsfläche ausgesät und - wie auf Seite 102 beschrieben - kultiviert.

### **2.2.3 Isolation makrovaskulärer Endothelzellen aus Koronararterien:**

Makrovaskuläre Endothelzellen wurden zunächst mit der gleichen Enzymmischung, die für die Isolation mikrovaskulärer Endothelzellen verwendet worden war, gewonnen. Gleichzeitig wurde auch die alleinige Wirkung von Collagenase II untersucht. Beide Verfahren ergaben vergleichbare Ergebnisse. Wegen der einfacheren Handhabung wurde im weiteren Collagenase II alleine verwendet. Die Menge der isolierten Endothelzellen hing stark von der Länge der präparierten Gefäße ab. Verlässlich ließen sich Kulturen anlegen, wenn die Gefäßsegmente > 5 cm lang waren. Die Zellen eines ca. 5 cm langen Gefäßsegmentes wurden auf eine Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> ausgesät und erreichten innerhalb von 10-14 Tagen Konfluenz.

### **2.2.4 Beurteilung der isolierten Zellen**

24 h nach Aussaat der isolierten Zellen wurden die Kulturschalen gespült, um verbliebene Herzmuskelzellen und Erythrozyten zu entfernen. Die jetzt mögliche Beurteilung der Zellen zeigte, daß sich Gruppen von 3 - 20 Zellen auf der Kulturschale gebildet hatten. Innerhalb einer Woche hatten sich die Zellen so vermehrt, daß ca. 50% der Kulturschale mit Zellen bedeckt war. Mit zunehmender Kulturdauer waren neben Zellen mit der typischen Morphologie einer Endothelzelle, auch Zellen anderer Morphologie sichtbar, die sich häufig zwischen die Endothelzellverbände mischten und nicht in Art eines Monolayers, sondern überlappend, wuchsen. Nach Passagieren der Zellen nahm der Anteil der nicht-endothelialen Zellen weiter zu. Eine Färbung der Endothelzellen mit den Endothelmarkern CD31, UEA-I und DiI-Ac-LDL und anschließender Analyse mit einem Durchflußzytometer bestätigte den visuellen Eindruck: in Primärkulturen fanden sich ca. 10-20% nicht-endotheliale Zellen, nach der ersten Passage stieg dieser Anteil auf 20-50% an (siehe Abbildung 2.3).



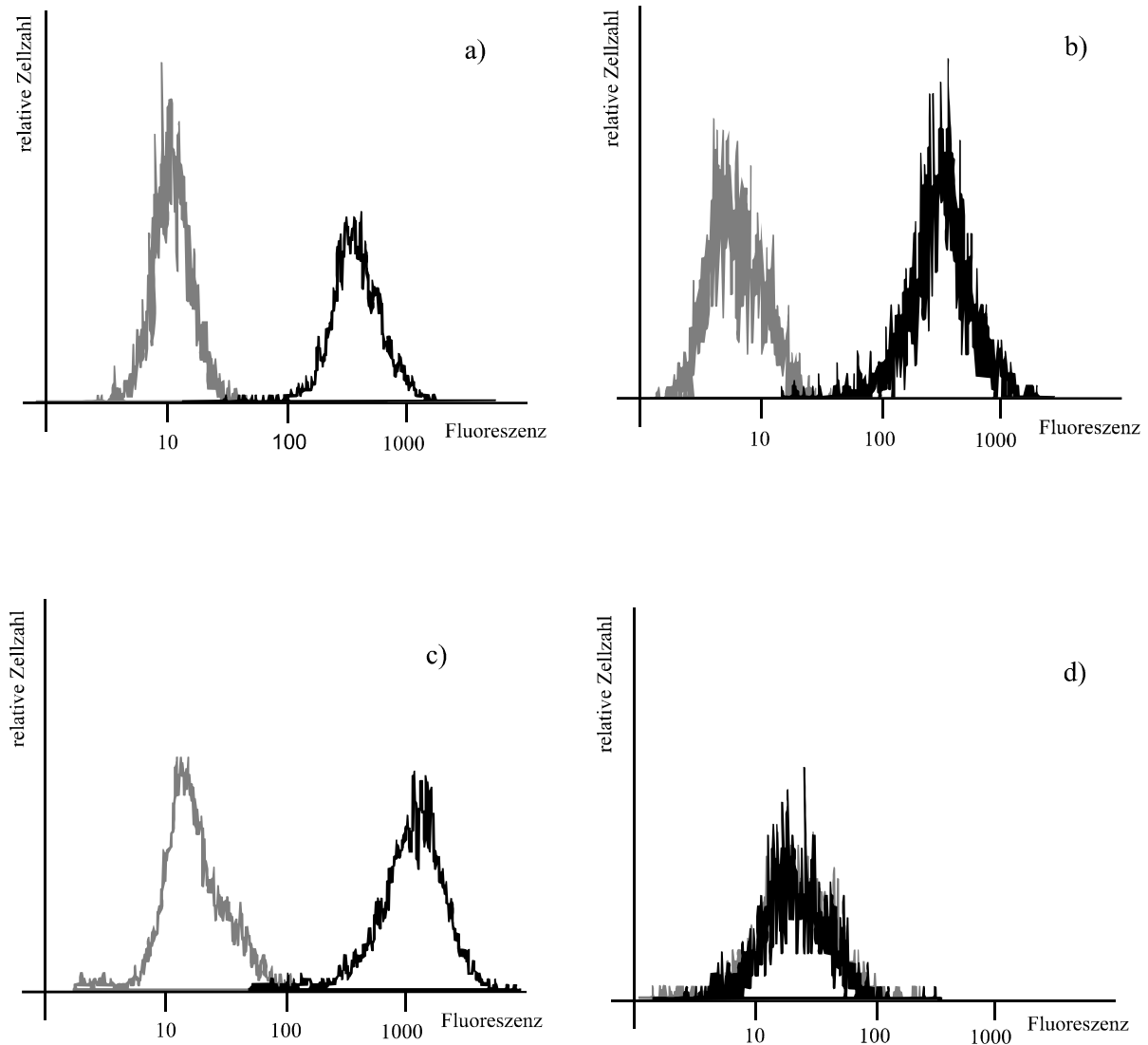
**Abbildung 2.3:** Aufnahme von Ac-Dil-LDL durch mikrovaskuläre und makrovaskuläre koronare Endothelzellen. Nach Inkubation der Zellen über 4 h mit Ac-Dil-LDL wurde die Fluoreszenz der Zellen im Durchflußzytometer analysiert. a) makrovaskuläre koronare Endothelzellen. b) mikrovaskuläre Endothelzellen nach Abtrennung nicht-endothelialer Zellen. c) mikrovaskuläre Endothelzellen vor Abtrennung nicht-endothelialer Zellen mit paramagnetischen Dynabeads. d) Fibroblasten dienen als Negativkontrolle

### **2.2.5 Zelltrennung mit paramagnetischen Dynabeads**

Da für die angestrebten Untersuchungen definierte und reine Zellkulturen benötigt wurden, mußte eine Technik entwickelt werden, die es ermöglicht, die in den isolierten Kulturen vermischten Zellen, zu trennen. Es wurden dazu paramagnetische Dynabeads, die mit UEA-I oder CD31 gekoppelt worden waren, verwendet. Nach Inkubation der Zellsuspension mit den Dynabeads, banden diese an die Oberfläche der Endothelzellen und es konnten die Zellen, an die Dynabeads gebunden hatten von denen an die keine Dynabeads gebunden hatten, durch ein magnetisches Feld getrennt werden. Versuche das Verhältnis Zellen zu Dynabeads zu optimieren, ergab, daß ein Verhältnis von 1:10 gute Trennergebnisse erbrachte. Bei niedrigeren Konzentrationen wurden nicht alle Zellen mit genügend Dynabeads beladen, um im Magnetfeld erfaßt zu werden. Höhere Konzentrationen an Dynabeads erbrachten keine Verbesserung der Zelltrennung. Obwohl UEA-I und CD31 spezifisch mit Endothelzellen reagieren (siehe Seite 15), wurde beobachtet, daß wiederholt nicht-endotheliale Zellen in der Endothelzellfraktion nach der Zelltrennung waren. Dies wurde immer dann beobachtet, wenn die Kulturschalen bei der Trennung bereits sehr dicht bewachsen waren. Offensichtlich gelang es beim Ablösen der Zellen von der Kulturschale nicht, die Zellen vollständig voneinander zu separieren, so daß Zellverbände von mehreren Zellen auftraten, in denen auch nicht-endotheliale Zellen eingebunden waren, und die dann im Zellverband mit den Endothelzellen bei der magnetischen Trennung erfaßt wurden. Es wurde daher angestrebt, die Zelltrennung bereits dann durchzuführen, wenn ca. 75% der Kulturschale mit Zellen bewachsen waren.

Nach der Zelltrennung zeigten die Zellen einen typischen endothelialen Phänotyp mit polygonaler Zellform, ein sog. "Pflastersteinrelief", mit eng aneinander gelagerten Zellen, die bei Konfluenz in einem einschichtigen Monolayer wuchsen. Nur vereinzelt waren Zellen, die eine andere Morphologie als die Endothelzellen aufwiesen, sichtbar. Während makrovaskuläre koronare Endothelzellen diese typische Zellform, die auch bei Nabelschnurendothelzellen beobachtet wurde, aufwiesen, zeigten die mikrovaskulären Zellen eine etwas länglichere Zellform und wuchsen in wirbelartigen, "Fischzug" ähnlichen Formen. Die Beurteilung der getrennten Zellkulturen zeigte, daß sie > 95% Endothelzellen enthielten (siehe Abb. 2.4). Neben der Reinheit der Zellkulturen mußte ihre Identität als vaskuläre Endothelzellen bestätigt werden. Die dazu durchgeführten Färbungen mit Antikörpern gegen von

Willebrandt Faktor zeigten eine homogene Anfärbung der mikrovaskulären als auch der makrovaskulären koronaren Endothelzellen.

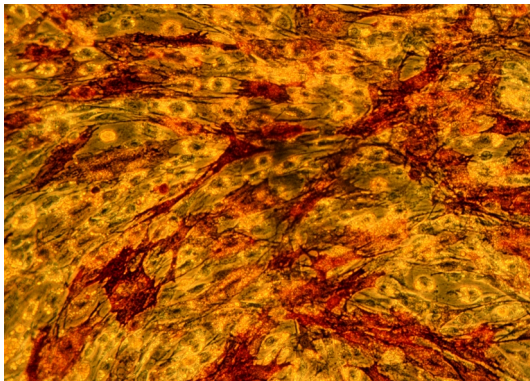


**Abbildung 2.4:** Analyse von mikrovaskulären und makrovaskulären koronaren Endothelzellen im Durchflußzytometer nach Färbung mit CD31 Antikörpern. Die Reinheit der Kulturen nach Abtrennung nicht-endothelialer Zellen wurde mit Hilfe des CD31 Antikörper beurteilt. a) makrovaskuläre koronare Endothelzellen. b) mikrovaskuläre Endothelzellen. Nabelschnurvenen Endothelzellen (c) dienten als Positivkontrolle, Fibroblasten (d) als Negativkontrolle

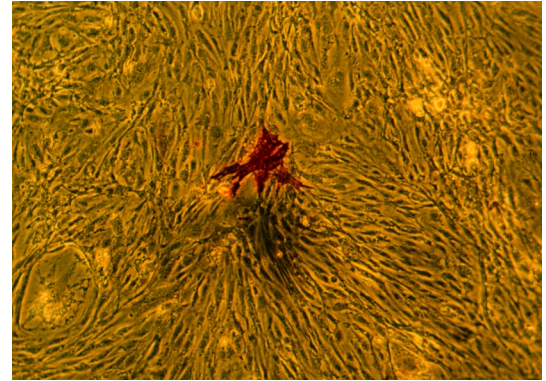


Die isolierten Endothelzellkulturen wurden auf alkalische Phosphatase Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß die Endothelzellfraktion der mit paramagnetischen Dynabeads getrennten Kulturen keine alkalische Phosphatase Aktivität besaß. Erfolgte die Färbung jedoch bei den nicht getrennten Kulturen, wies ein großer Anteil der Zellen eine positive Reaktion auf. Die alkalische Phosphatase positiven Zellen waren meist größer als Endothelzellen, zeigten eine unregelmäßige Zellbegrenzung mit z.T. langen Zellausläufern und wuchsen nicht wie Endothelzellen kontaktinhibiert, sondern häufig über der Endothelzellschicht. Dies läßt vermuten, daß alkalische Phosphatase positive Zellen nicht Endothelzellen sondern möglicherweise Perizyten entsprachen.

a)



b)



**Abbildung 2.5:** Darstellung der alkalischen Phosphataseaktivität mikrovaskulärer Endothelzellen vor (a) und nach (b) Abtrennung nicht endothelialer Zellen durch paramagnetische Dynabeads. Alkalische Phosphataseaktivität stellte sich rot dar



## 2.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, daß es möglich ist, Endothelzellen aus Koronararterien und aus der Mikrozirkulation menschlicher Herzen mit hoher Ausbeute und großer Reinheit zu isolieren.

Die Isolation makrovaskulärer koronarer und mikrovaskulärer Endothelzellen aus menschlichen Herzen war bislang nicht beschrieben worden. Es existierten lediglich einige Publikationen, die die Isolation mikrovaskulärer kardialer Endothelzellen bei Tieren wie Kaninchen ([216](#)), Ratte ([187](#)) und Meerschweinchen ([167](#)) beschrieben.

Wie aus diesen Publikationen ersichtlich, war offensichtlich die Perfusion des Gewebes mit einer Enzymlösung wesentlich für eine effektive Isolierung kardialer mikrovaskulärer Endothelzellen. Dieser Schritt, der von Nees et al ([167](#)) bei Isolation von Endothelzellen aus Meerschweinchenherzen eingesetzt wurde, konnte die Zellausbeute gegenüber der von Simionescu et al ([216](#)) beschriebenen Methode verbessern. Offenbar führt die Perfusion des Herzens mit Enzymen zu einer Desintegration der kleinen Gefäße vom umliegenden Gewebe und erhöht so die Ausbeute der zu isolierenden Endothelzellen.

Eine Publikation von Nishida et al ([173](#)) zur Isolation von Endothelzellen aus menschlichen Herzen zeigte, wie schwierig die Etablierung einer Isolationsmethode für Endothelzellen aus menschlichem Myokardgewebe ist. Die Autoren konnten nur geringe Mengen mikrovaskulärer Endothelzellen isolieren. Eine geringe Zahl isolierter Zellen machte es schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, Experimente in frühen Kulturpassagen durchzuführen, bevor lange Kultivierung und wiederholte Zellteilungen zu einer Alterung der Zellen führen ([83](#), [235](#), [249](#)).

Im Gegensatz zu Versuchen mit Nagern stand bei den hier durchgeführten Experimenten zur Isolation menschlicher kardialer Endothelzellen kein komplettes Herz zur Verfügung, sondern nur Myokardstücke von ca. 5 cm Durchmesser. Es mußte daher die Technik der Isolierung den Gegebenheiten angepaßt werden. Schwierig war zunächst, eine ausreichende Perfusion des Gewebes zu erzielen, da die Enzymlösung an den Schnittkanten des Gewebes ablief.

Durch Verschließen größerer, angeschnittener Gefäße mit kleinen Klemmen konnte jedoch meist eine gute Perfusion erreicht werden.

Durch die hier beschriebene Isolationsprozedur konnte eine ca. 100-fach bessere Ausbeute im Vergleich zu den von Nishida et al. veröffentlichten Daten zur Isolation von humanen kardialen Endothelzellen ([173](#)) erzielt werden.

Die Kontamination von Endothelzellkulturen mit nicht-endothelialen Zellen ist ein immerwährendes und stets neu zu lösendes Problem. Während bei der Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen aus Nagern über Probleme einer Verunreinigung mit nicht-endothelialen Zellen nicht berichtet wurde ([167](#), [187](#)), war bei menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen bereits in der Primärkultur eine Verunreinigung mit nicht-endothelialen Zellen zu erkennen. Die nicht-endothelialen Zellen wuchsen schneller als Endothelzellen und tendierten dazu, die Kultur bei zunehmender Dauer zu überwachsen. Es mußte daher zusätzlich eine Methode zur Reinigung der isolierten Zellen von nicht-endothelialen Zellen gefunden werden.

Die bislang verwendeten Trennmethode für Zellen waren wegen ihrer schlechten Diskriminationsfähigkeit oder geringen Leistungsfähigkeit nicht anwendbar.

Die Isolation einzelner Zellklone wird zur Isolierung bestimmter Zellpopulationen aus einem Zellgemisch angewandt. Dazu wird das zu trennende Zellgemisch so ausgesät, daß im Durchschnitt pro Kulturgefäß eine Zelle gelangt. Diese Technik ist bei gut und schnell wachsenden Zellen anwendbar und erprobt ([40](#)). Mikrovaskuläre kardiale menschliche Endothelzellen wachsen jedoch langsam und gehen bei schlechten Wachstumsbedingungen in Apoptose über ([91](#)). Offensichtlich spielen neben Matrixkomponenten und Wachstumsfaktoren ([83](#)) auch parakrin sezernierte Komponenten für das Wachsen und Überleben der Zellen eine Rolle, die bei zu geringer Zelldichte nicht gewährleistet sind. Daher konnte die Technik der Reinigung der Zellkulturen durch klonale Selektion bei kardialen mikrovaskulären Endothelzellen nicht angewendet werden.

Eine weitere Methode zur Zelltrennung ist die Dichtegradientenzentrifugation. Diese Methode

beruht darauf, daß sich Zellen entsprechend ihrer Dichte in einem Dichtegradienten anordnen. Diese Methoden wurden zur Isolierung von Kapillaren aus dem Gehirn ([28](#)) und von Nees et al. ([167](#)) zur Anreicherung von kardialen mikrovaskulären Endothelzellen verwendet. Zur Abtrennung von menschlichen kardialen Endothelzellen von nicht-endothelialen Zellen eignete sich diese Methode jedoch nicht, da die Dichten der zu trennenden Zellen sehr ähnlich waren und so Überlappungsbereiche bestanden, die eine effektive Zelltrennung unmöglich machten.

Als weitere Methode zur Isolierung bestimmter Zellpopulationen aus einem Zellgemisch ist die Durchflußzytometrie angewendet worden. Nach Markierung von Endothelzellen mit spezifischen Markern, z.B. mit Ac-DiI-LDL, das sehr schnell von Endothelzellen aufgenommen wird, lassen sich endotheliale fluorenszenzmarkierte Zellen von nicht markierten in einem Flüssigkeitsstrom mit speziellen Durchflußzytometern trennen ([173](#), [251](#)). Diese Methode erfordert einen hohen apparativen Aufwand, die Trennleistung ist relativ niedrig, und die isolierten Zellen sind durch bakterielle Kontaminationen während der Trennprozedur gefährdet.

Auch paramagnetische Dynabeads sind zur Trennung von Zellpopulationen verwendet worden. Diese lassen sich einfach mit Antikörpern oder anderen Proteinen koppeln. Die mit Antikörpern gekoppelten Dynabeads lagern sich an die das entsprechende Antigen tragenden Zellen an. In einem Magnetfeld können dann die mit Dynabeads beladenen Zellen von Zellen, die keine Dynabeads gebunden haben, abgetrennt werden. Mit dieser Methode ist es sogar möglich, Leukozytensubpopulationen aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften zu trennen ([152](#)). Auch Endothelzellen konnten mit dieser Methode durch Kopplung des Ulex europaeus Lectins an paramagnetischen Dynabeads aus Deziduagewebe angereichert werden ([75](#)).

Paramagnetische Dynabeads wurden ebenfalls auf ihre Tauglichkeit zur Trennung kardialer Endothelzellen von nicht-endothelialen Zellen getestet. Neben dem Anti-Endothelzellantikörper MoAB 1915 wurde Ulex europaeus an die paramagnetischen Dynabeads gekoppelt. Es zeigte sich, daß sowohl der Antikörper als auch das Lectin zur Zelltrennung geeignet waren. Die Zelltrennung erbrachte die besten Ergebnisse, wenn das Verhältnis Zellen – Dynabeads etwa 10 Dynabeads pro Endothelzelle betrug. Bei höheren Mengen an Dynabeads pro Zelle wurde keine weitere Verbesserung der Zelltrennung erreicht, bei einem geringeren Zell-Dynabeadsverhältnis wurden nicht alle Endothelzellen erfaßt. Die Dynabeads wurden innerhalb

weniger Tage von den Endothelzellen freigesetzt und beeinflussten weder die Morphologie noch meßbar zelluläre Funktionen. Wenn die Kulturschalen zum Zeitpunkt der Trennung bereits konfluent bewachsen waren, mußte oftmals eine zweite Zelltrennung mit paramagnetischen Dynabeads angeschlossen werden. Die Effektivität der durchgeführten Zelltrennungen konnte sowohl durch immunologische als auch durch histologische Färbungen bestätigt werden und zeigte Endothelzellkulturen mit einem Anteil nicht-endothelialer Zellen, der deutlich geringer als 5% war.

Die Zelltrennung mit paramagnetischen Dynabeads hat sich als zuverlässig und gut reproduzierbar erwiesen. Sie erlaubte es, große Mengen mikrovaskulärer Endothelzellen in kurzen Zeiträumen zu bearbeiten. Diese Methode könnte daher auch auf andere Zellsysteme angewendet werden, die bislang nicht als reine Zellkulturen isoliert werden konnten. Damit konnte neben der Forderung nach einer ausreichenden Menge der isolierten Zellen auch die zweite Forderung nach hochreinen Kulturen erfüllt werden. Diese Voraussetzungen ermöglichten es, die isolierten Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion zu charakterisieren.

Die Isolation koronarer Endothelzellen wurde in Anlehnung an die bei Nabelschnurvenen verwendete Technik durchgeführt. Die Menge der isolierten koronaren Endothelzellen war von der Länge des zur Verfügung stehenden Koronargefäßes abhängig und geringer als die der isolierten Zellen der kardialen Mikrozirkulation. Die isolierten koronaren Endothelzellen wurden ebenso wie die mikrovaskulären Endothelzellen mit paramagnetischen Kügelchen von nicht-endothelialen Zellen gereinigt und unter identischen Bedingungen kultiviert, um für charakterisierende Untersuchungen identische Voraussetzungen zu haben.

Eine vergleichende Betrachtung der zellulären Morphologie beider Endothelzellen ergab, daß koronare Endothelzellen - wie es z.B. für Endothelzellen aus Nabelschnurvenen beschrieben worden war ([115](#)) – eine polygonale Zellform ausbildeten und in einem kontaktinhibierten Monolayer wuchsen. Endothelzellen der Mikrozirkulation bildeten dagegen eine länglichere, spindelartige Zellform aus und das Gesamtbild zeigte ein unruhigeres Wachstumsbild mit Zellen, die in wirbelartigen Strukturen angeordnet waren.

Wie bei den histologischen Untersuchungen konnten, sowohl bei makro- als auch mikrovas-

kulären Endothelzellen, die Expression des von Willebrand Faktors (116) und Ulex Europaeus Lectin (4) bindende Oberflächenstrukturen nachgewiesen werden. Diese Parameter sind damit geeignet, Endothelzellen gegenüber nicht-endothelialen Zellen abzugrenzen, jedoch nicht, mikrovaskuläre von makrovaskulären Endothelzellen zu unterscheiden. Auch das CD31 Antigen (172) konnte auf Endothelzellen beider Gefäßregionen nachgewiesen werden. CD31 eignet sich aufgrund der starken konstitutiven Oberflächenexpression (171) auf Endothelzellen, besonders gut zur Identifikation von Endothelzellen, jedoch nicht zur Unterscheidung von Endothelzellen unterschiedlicher Gefäßregionen.

Es ist postuliert worden, daß mikrovaskuläre Endothelzellen alkalische Phosphataseaktivität besäßen und diese als Unterscheidungskriterium von makrovaskulären Zellen verwendet werden könnte. Die Vermutung wurde von histologischen Untersuchungen abgeleitet, die eine positive alkalische Phosphatasereaktion im Bereich kleiner Gefäße gezeigt hatten (41) als auch von Färbungen mit Antikörpern gegen alkalische Phosphatase (211). Auf der anderen Seite wurde beschrieben daß Perizyten ebenfalls alkalische Phosphatase Aktivität besitzen würden (30).

In der histologischen Untersuchung menschlichen Myokardgewebes hatte sich eine heterogene Verteilung alkalischer Phosphataseaktivität in den Gefäßen gezeigt, mit Bevorzugung der kleinen Gefäße und Kapillaren, während im Bereich der großen Gefäße keine alkalische Phosphataseaktivität nachweisbar war. Anhand der histologischen Präparate konnte jedoch nicht entschieden werden, ob Endothelzellen selbst alkalische Phosphataseaktivität zugeordnet werden kann. Um dieses Problem weiter zu klären, wurden auch an Zellkulturen alkalische Phosphatase Aktivität histochemisch untersucht. Kultivierte Endothelzellen zeigten keine alkalische Phosphataseaktivität. In Primär- und Mischkulturen dagegen konnte bei einigen Zellen alkalische Phosphataseaktivität nachgewiesen werden. Da sich auch die Morphologie der alkalische Phosphatase positiven Zellen von der der Endothelzellen unterschied, muß vermutet werden, daß alkalische Phosphatase positive Zellen nicht Endothelzellen, sondern einer anderen Zellart, möglicherweise Perizyten, entsprachen.

Der Kontamination der isolierten kardialen Endothelzellen mit Perizyten ist bislang keine ausreichende Bedeutung geschenkt worden. Aufgrund der hier gemachten Erfahrungen kann festgestellt werden, daß alkalische Phosphatase Aktivität nicht eine Eigenschaft kardialer

mikrovaskulärer Endothelzellen ist, sondern wahrscheinlich kontaminierender Perizyten. Perizyten stellen einen wesentlichen Anteil der isolierten nicht-endothelialen Zellen dar und können vor allem in den höheren Passagen zu einer Fehldeutung der Eigenschaften kardialer mikrovaskulärer Endothelzellen führen.

Bei der Isolationsprozedur der mikrovaskulären Endothelzellen ist es möglich, daß neben den vaskulären Endothelzellen auch Zellen des Epikards oder des Endokards oder auch großer Gefäße mit isoliert werden. Eine Beimengung von Zellen aus großen Gefäßen ist durch die Isolationsprozedur gegeben und kann nicht verhindert werden. Da die Mikrozirkulation jedoch den größten Anteil der Zirkulation des Herzens ausmacht ([15](#)) kann davon ausgegangen werden, daß auch der überwiegende Anteil der isolierten Endothelzellen aus der Mikrozirkulation stammt.

Die morphologische Charakterisierung mikro- und makrovaskulärer kardialer Endothelzellen zeigte Unterschiede der Zellform auf. Die in den Kapiteln 3 bis 5 dargestellte Charakterisierung der beiden Zellarten belegt auch funktionelle Unterschiede in der Reaktion beider Zellarten auf oxidierte Lipoproteine, sowie eine unterschiedliche Expression von Adhäsionsrezeptoren für die Interaktion mit Leukozyten. Diese Befunde können als Bestätigung gesehen werden, daß die isolierten Zellpopulationen aus unterschiedlichen Gefäßbereichen stammen. Da Liganden für L-Selectin vorwiegend auf mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert werden, ergäbe sich bei Generierung spezifischer Antikörper gegen diese L-Selectin-Liganden eine Möglichkeit, auch mit immunologischen Methoden eine Unterscheidung makrovaskulärer koronarer und mikrovaskulärer kardialer Endothelzellen vorzunehmen.

Die hier beschriebenen Methoden ermöglichten es, Endothelzellen aus menschlichen Koronararterien und der Mikrozirkulation des Herzens zu isolieren. Die zur Verfügung stehenden Muskelstücke lieferten durch Etablierung einer neuen Isolationstechnik, ausreichende Mengen mikrovaskulärer Endothelzellen. Es ist mit diesen Zellen möglich, funktionelle Experimente bereits in frühen Passagen durchzuführen. Die gewonnenen

kardialen Zellen konnten durch mehrere immunologische Marker als Endothelzellen identifiziert werden. Durch Einführung einer Zelltrennungsprozedur mit Hilfe paramagnetischer Dynabeads war es möglich, Zellkulturen mit großer Reinheit zu gewinnen, wie es sonst nur für Endothelzellen aus großen Gefäßen, z.B. Nabelschnurvenen, möglich war. Die funktionelle Charakterisierung zeigte eine Heterogenität der Eigenschaften beider Zellarten und wird in den folgenden drei Kapiteln dargestellt.

### **3 Wirkungen von normalen und oxidiertem LDL auf mikro- und makrovaskuläre kardiale Endothelzellen**

#### **3.1 Einleitung**

Das Auftreten oxidativ modifizierter Low Density Lipoproteine (ox-LDL) ist ein charakteristischer Befund in den subendothelialen Cholesterinablagerungen früher arteriosklerotischer Läsionen ([265](#)). Sie induzieren eine Dysfunktion des Endothels ([62](#), [73](#)) und eine chronische Entzündungsreaktion, die durch inflammatorische Zytokine, z.B. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) ([13](#)) und Wachstumsfaktoren ([153](#)) vermittelt wird und durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und Akkumulation von Leukozyten, vor allem Mono- und Lymphozyten, gekennzeichnet ist ([98](#), [128](#)). Eine weitere charakteristische Wirkung der oxidierten Lipoproteine auf Endothelzellen ist eine Verschiebung der koagulatorischen Homöostase in Richtung einer vermehrten Koagulation, die sich *in vitro* u.a. in einer erhöhten Aktivität des Plasminogen Aktivator Inhibitors-1 (PAI-1) ([95](#), [130](#), [238](#)) und einer verminderten Expression von Gewebe Plasminogen Aktivator (t-PA) ([130](#), [140](#)) widerspiegelt.

Im Gegensatz zu den bei der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen beteiligten Prozessen, ist die aus der klinischen Erfahrung und durch Studien belegte bevorzugte Lokalisation arteriosklerotischer Läsionen in bestimmten Gefäßbereichen weniger gut zu verstehen. Neben hämodynamischen Faktoren ([8](#), [237](#)) könnten auch lokal unterschiedliche Reaktionen der Gefäßzellen auf umgebenden Stimuli eine Ursache darstellen ([252](#)).

Grundsätzlich wäre es möglich, dieses Phänomen der bevorzugten Lokalisation arteriosklerotischer Läsionen in bestimmten Gefäßarealen in Tiermodellen zu untersuchen. Diese sind jedoch aufgrund der begrenzten Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das menschliche System diesbezüglich nur begrenzt aussagefähig ([72](#)). Unterschiede zwischen Gefäßen verschiedener Spezies ([10](#)), aber auch verschiedener Körper- und Organregionen einer Spezies ([77](#)), lassen es notwendig erscheinen, zum Studium der koronaren Herzerkrankung, Koronargefäße und



aus ihnen gewonnenes Material zu verwenden, da die Verwendung von Gefäßen aus anderen Körperregionen, z.B. aus dem embryonalen Gewebe der Nabelschnur, nicht die koronarspezifischen Eigenheiten aufweist.

Direkte Untersuchungen am Menschen über die Einlagerung von Fetten in die Gefäßwand sind im Augenblick noch in einem experimentellen Stadium ([267](#)). Als Alternative zur Untersuchung der gefäßspezifischen Eigenheiten bietet sich das in Kapitel 2 beschriebene System kultivierter Endothelzellen aus koronaren Endothelzellen und der Mikrozirkulation des Herzens an. Die Zellen aus Koronararterien stammen aus Gebieten, in denen häufig arteriosklerotische Läsionen beobachtet werden, während die mikrovaskulären Endothelzellen aus einem Gefäßareal, in dem arteriosklerotische Plaques nicht beobachtet werden, stammen.

In der vorliegenden Studie wurden daher Zellen aus menschlichen Koronararterien isoliert und endotheliale Funktionen, die in der Pathogenese der Arteriosklerose von Bedeutung sind, *in vitro* untersucht. Es wurden zusätzlich Endothelzellen aus der Mikrozirkulation des Herzens isoliert und beide Zellarten hinsichtlich ihrer Reaktion auf oxidativ modifizierte Lipoproteine miteinander verglichen.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 *Isolierung und Charakterisierung der LDL*

#### 3.2.1.1 Isolierung

Bei der schrittweisen Gradientenultrazentrifugation bildete sich im ersten Schritt eine Dichte der Kaliumbromidlösung von  $D = 1,019 \text{ g/ml}$  aus. Inhaltsstoffe mit Dichten  $< 1,019 \text{ g/ml}$  wanderten an die Oberfläche, Stoffe mit Dichten  $> 1,019 \text{ g/ml}$  an den Boden des Zentrifugengefäßes.

Eine scharf begrenzte, weißliche Bande im oberen Sechstel des Zentrifugengefäßes, mit einer Dichte von  $D < 1,019 \text{ g/ml}$ , bildete sich über einer klaren, etwa  $3/6$  des Gefäßes ausmachenden zum Boden hin unscharf begrenzten Bande, aus.  $2/6$  des Zentrifugengefäßes füllte am Boden ein mittel - dunkelgelber Bodensatz. Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz weiter verwendet.

Bei dem zweiten Zentrifugationsschritt bildete sich im Kopfteil des Gefäßes eine mittelgelbe, nach unten scharf begrenzte, ca.  $1/6$  des Zentrifugengefäß ausfüllende, Bande aus.

Dieser Überstand ( $D < 1,063 \text{ g/ml}$ ) stellten die LDL Fraktion dar. Die mittlere, ca.  $3/6$  ausfüllende, nach unten unscharf begrenzte Bande, sowie der mittel - dunkelgelbe Bodensatz wurden verworfen.

Es konnten aus 20 ml Plasma ca. 4 - 5 ml Überstand gewonnen werden (Proteinkonzentration: zwischen 1 - 2 mg/ml). Diese Fraktion enthielt die LDL.

### **3.2.1.2 Aufarbeitung der LDL**

Zur weiteren Reinigung und Umpufferung wurden die isolierten LDL über eine Gelfiltrationsäule (Sephadex 75) gegeben. Die Absorptionen von 100 Fraktionen des Eluates (Fraktion = 1,2 ml/min.) wurde bei 280 nm gemessen. Zwischen den Fraktionen 36 - 37 wurde eine relative Absorption von 1,224 gemessen. Die Fraktionen Nr. 36 + 37 wurden zur weiteren Bearbeitung aufgehoben.

### **3.2.1.3 Charakterisierung der n-LDL**

In der Agarose Gelelektrophorese mit dem Lipidophor ALL IN 12 System erkannte man nach Auftragen einer Plasmaprobe auf dem Agarose Träger zwei scharfe Banden: eine Beta-Lipoproteinbande und eine Alpha-Lipoproteinbande. Nach Auftragen der durch Ultrazentrifugation gewonnene LDL-Fraktion bildete sich eine scharfe Bande, die der Beta-Lipoproteinbande entsprach und somit das LDL repräsentierte.

Die Bestimmungen des Cholesterin- und Triglyceridgehaltes in der durch Zentrifugation gewonnenen Fraktion zeigte bei insgesamt 7 Bestimmungen einen mittleren Cholesteringehalt der Fraktionen von  $222 \pm 23$  mg/dl und einen Triglyceridgehalt von  $58 \pm 5$  mg/dl. Setzte man nun die Ergebnisse ins Verhältnis, so ergab sich ein Cholesterin/Triglyceridquotient von 1 : 3,8. Dieser Quotient entsprach somit dem erwarteten Verhältnis von Cholesterin/Triglyceriden in LDL.

#### **3.2.1.4 Herstellung und Charakterisierung der ox-LDL**

Um eine Vergleichbarkeit der hier dargestellten Untersuchungen mit denen anderer Autoren zu ermöglichen, wurde zum einen der Oxidationsgrad der verwendeten LDL bestimmt und zum anderen die am weitesten verbreitete Methode zur Modifikation der LDL, die Oxidation durch 2-wertige Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ), verwendet.

Zur Beurteilung des Oxidationsgrades der ox-LDL wurden untersucht :

1. Die relative Mobilität der LDL in der Agarose Gelelektrophorese.

Auf dem Agarose Gelträger wurde die Laufgeschwindigkeit der ox- LDL im Vergleich zu n-LDL beurteilt (10 µg/ml Protein aufgetragen). Die Banden waren scharf begrenzt und unterschieden sich in ihrer Laufstrecke. Vom Startpunkt gemessen war die n-LDL Bande 0,6 cm, die ox-LDL Bande 1,1 cm weit gelaufen. Setzt man nun beide Strecken ins Verhältnis, so ergab sich ein Lauffaktor von 1 : 1,8.



**Abbildung 3.1:** Agarose Gel Elektrophorese. n-LDL (untere Bande) und ox-LDL (obere Bande) zeigen eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit. Der Auftragungspunkt der Proben ist rechts

## 2. Bestimmung des Gehaltes an TBARS reaktiven Substanzen

Die Quantifizierung des Oxidationsgrades der LDL erfolgte durch Bestimmung der thiobarbitursäurereaktiven Äquivalente (TBARS). Der mit der TBARS Methode gemessene Malondialdehydgehalt der ox-LDL betrug  $13,63 \pm 1,18$  nmol Malondialdehyd/mg LDL Protein ( $n = 4$ ). Die Ergebnisse der Malondialdehydmessungen wurden für n-, und ox-LDL in Abbildung 3.2. aufgetragen.

Für oxidiertes LDL wird in der Literatur ein Oxidationsgrad, der 15-20 nmol TBARS/mg LDL entspricht, angeführt ([231](#), [260](#)), d.h. die in diesen Versuchen verwendeten ox-LDL entsprechen von ihrem Oxidationsgrad, den von anderen Autoren verwendeten Oxidationsgraden.

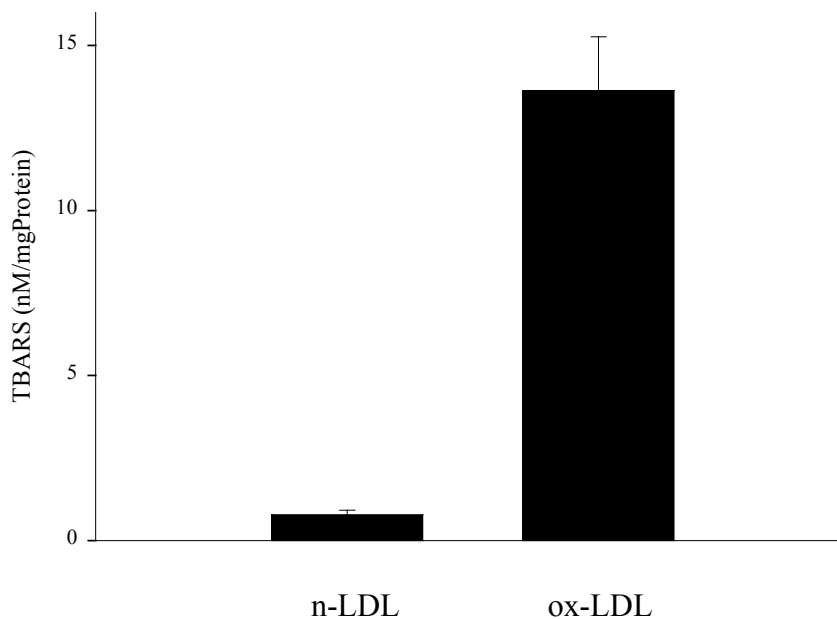
## 3. Die Aufspaltung der Apo-B 100 Bande in der SDS-PAGE.

Ein SDS-PAGE Kleingel wurde mit n- und ox-LDL Banden in aufsteigender Proteinkonzentration (2,5, 5, 10 und 20 µg/ml) beladen. Die n-LDL Banden zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Intensität einer Bande kurz unterhalb des Startpunktes. Diese Bande stellte das Apo-B 100 Protein mit einem Molekulargewicht von 513 KD dar ([119](#)).

Bei der Auftrennung der ox-LDL Proben zeigte sich ab einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml eine deutliche Verringerung der Apo-B 100 Proteinbande und das Auftreten von multiplen Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich unter 250 KDa. (wie bei [73](#)) beschrieben).

### 3.2.1.5 Endotoxinnachweis

Nach 60 Minuten Inkubation bei 37 ° C bildete sich bei den Positivkontrollen ab einem Endotoxingehalt von 0,06 EU/ml ein festes Gel aus. Bei den LDL-Proben kam es in keinem Fall zu einer festen Gelbildung. Der Endotoxingehalt der LDL-Proben lag damit unter 0,06 EU/ml.



**Abbildung 3.2:** Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBARS) Assay: Der TBARS Assay wurde verwendet, um den Oxidationsgrad von n-LDL und mit  $\text{Cu}^{2+}$  oxidierten LDL zu bestimmen (n = 4)

### ***3.2.2 Wirkungen der LDL Fraktionen auf die t-PA-Sekretion mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen***

Die t-PA Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

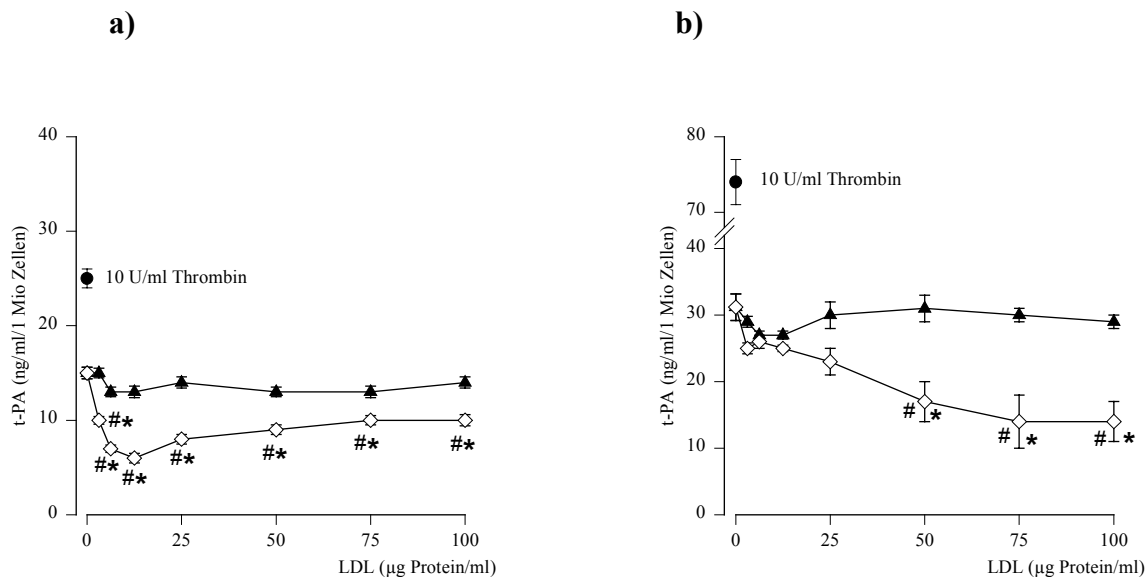
Bei mikrovaskulären Endothelzellen beobachtete man über den gesamten Bereich der eingesetzten n-LDL Proteinkonzentrationen keine signifikante Änderung der t-PA Sekretion ( $13,7 \pm 0,8$  ng/ml/1 Mio Zellen) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $14,6 \pm 0,6$  ng/ml/1 Mio Zellen).

Mit ox-LDL stimulierte Zellen sezernierten niedrigere t-PA Mengen über den gesamten Proteinkonzentrationsbereich von 3 - 100 µg/ml gegenüber der Kontrolle sowie den Zellen, die mit n- LDL inkubiert wurden ( $p < 0,05$ ). Die maximale Verringerung der t-PA Sekretion mit  $6,3 \pm 0,5$  ng/ml/1 Mio Zellen fand sich bei 12,5 µg/ml LDL-Protein.

Unstimulierte mikrovaskuläre Endothelzellen zeigten gegenüber unstimulierten koronaren Endothelzellen eine signifikant erniedrigte t-PA Sekretion ( $p < 0,05$ ,  $14,6 \pm 0,6$  µg/ml/1 Mio Zellen vs.  $29,6 \pm 1,2$  µg/ml/1 Mio Zellen). Eine Stimulation der Zellen mit 10 U/ml Thrombin induzierte einen signifikanten Anstieg der t-PA Sekretion.

Bei koronaren Endothelzellen ergab sich unter Stimulation mit n-LDL im Konzentrationsbereich von 3 - 100 µg/ml Protein kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle. Ox-LDL induzierten im gesamten Konzentrationsbereich von 3 -100 µg/ml Protein eine signifikante Erniedrigung der t-PA Sekretion gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,05$ ), ab einer Proteinkonzentration von 12,5 - 100 µg/ml auch eine signifikante Erniedrigung gegenüber den durch n-LDL induzierten t-PA Meßwerten ( $p < 0,05$ ). Bei 100 µg/ml LDL-Protein erreichte die t-PA Konzentration minimal  $14 \pm 3$  µg/ml/1 Mio Zellen gegenüber  $30 \pm 1$  µg/ml bei Kontrollen und  $31 \pm 2$  µg/ml/1 Mio Zellen bei n-LDL.





**Abbildung 3.3:** Sekretion von t-PA in den Kulturüberstand nach Stimulation von mikrovaskulären (a) und makrovaskulären koronaren Endothelzellen (b) mit n-LDL (Dreiecke) oder ox-LDL (Rauten). # =  $p < 0,05$  gegen Kontrollen, \* =  $p < 0,05$  gegen n-LDL

### 3.2.3 Wirkungen der LDL Fraktionen auf die PAI-1 Aktivität und PAI-1 Sekretion mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen

Die PAI-1 Aktivität wurde durch die hemmende Wirkung des PAI-1 auf t-PA Aktivität bestimmt. Dazu wurde der die PAI-1 Aktivität enthaltenden Probe eine definierte Menge t-Pa zugesetzt und die verbleibende t-PA Aktivität mit Hilfe eines chromogenen Substrates bestimmt. Die PAI-1 Antigen Konzentration wurde mit Hilfe eines ELISA ermittelt.

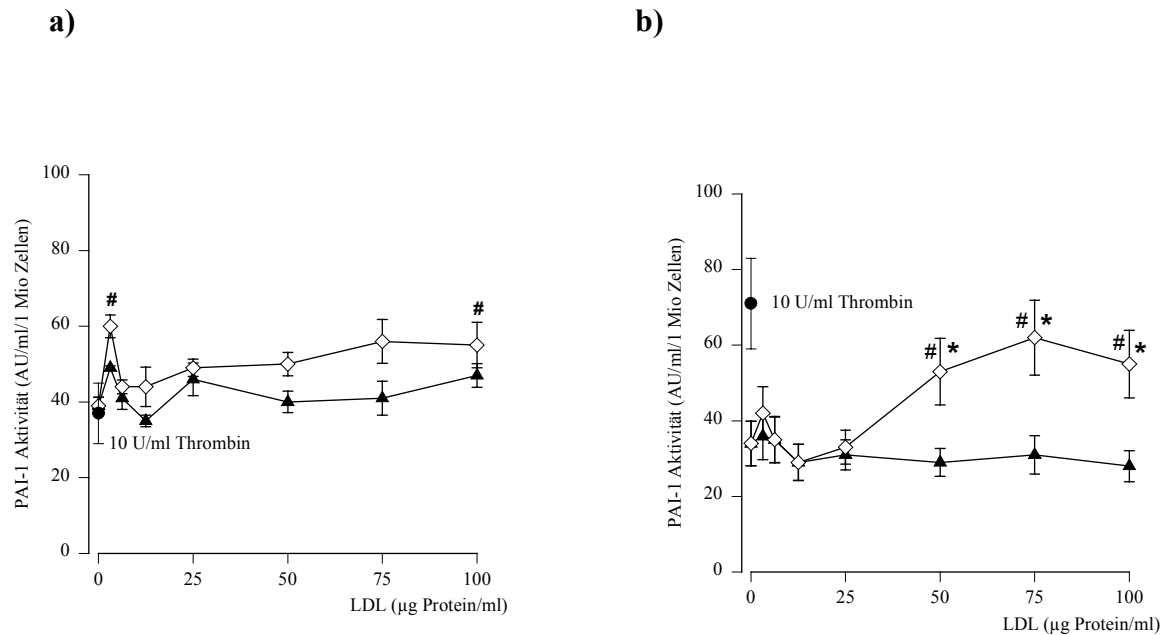
Für mikrovaskuläre Endothelzellen zeigten sich bei Inkubation mit n-LDL über den gesamten getesteten Proteinbereich (3 - 100 µg/ml) gleichbleibende PAI-1 Aktivitäten. Bei Inkubation mit ox-LDL wurde zunächst ein leichter Anstieg der PAI-1 Aktivität beobachtet, die gemessenen PAI-1 Werte waren bei nur Proteinkonzentrationen von 3 µg/ml und 100 µg/ml signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht. Dies spiegelt wahrscheinlich eher

versuchsbedingte technische Variationen wieder als eine wirkliche Steigerung der PAI-1 Aktivität (Abbildung 3.4).

Bei Inkubation koronarer Endothelzellen mit n-LDL kam es zu einem leichten Abfall der PAI-1 Aktivität, dann aber bis 100 µg/ml zu gleichbleibenden PAI-1 Aktivitäten.

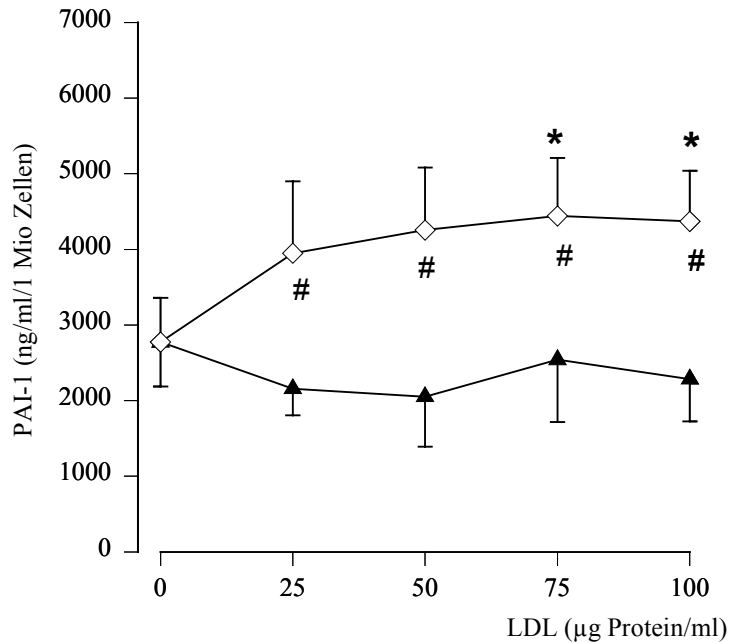
ox-LDL induzierte bei zunehmender LDL-Konzentration einen Anstieg der PAI-1 Aktivität, die bis maximal  $62 \pm 10$  AU/ml/1 Mio Zellen bei 75 µg/ml LDL stieg und bei 100 µg/ml wieder auf  $55 \pm 9$  AU/ml/1 Mio Zellen abfiel. Diese Werte waren signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle und den durch n-LDL induzierten Werten erhöht (Abbildung 3.4).

Die PAI-1 Aktivitäten in unbehandelten mikro- und makrovaskulären Endothelzellen unterschieden sich nicht signifikant. Bei Stimulation mit 10 U/ml Thrombin kam es nur bei makrovaskulären koronaren Endothelzellen zu einem Anstieg der PAI-1 Aktivität.



**Abbildung 3.4:** PAI-1 Aktivität von mikrovaskuläre Endothelzellen (a) und koronare Endothelzellen (b) unter Inkubation mit n-LDL (Dreiecke) und ox-LDL (Rauten). # =  $p < 0,05$  gegen Kontrollen, \* =  $p < 0,05$  gegen n-LDL

Die Sekretion von PAI-1 Antigen wurde nur in Kulturen makrovaskulärer koronarer Endothelzellen bestimmt. Bei Inkubation mit n-LDL zeigte sich keine signifikante Änderung der PAI-1 Konzentration. Bei Inkubation mit ox-LDL kam es jedoch zu einem Anstieg der PAI-1 Konzentration, die bei 100 µg/ml ox-LDL signifikant sowohl gegenüber den unbehandelten Kontrollen, als auch gegenüber den mit n-LDL behandelten Kulturen erhöht war ( $p < 0.05$ , Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** Sekretion von PAI-1 Antigen durch makrovaskuläre koronare Endothelzellen unter Inkubation mit n-LDL (Dreiecke) und ox-LDL (Rauten). # =  $p < 0,05$  gegen Kontrollen, \* =  $p < 0,05$  gegen n-LDL

### 3.2.4 Wirkungen der LDL Fraktionen auf die prokoagulante Aktivität (PKA) mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen

Als prokoagulante Aktivität wurde die Zeit in Sekunden gemessen, bei der eine Thrombusbildung auftrat. Eine Verkürzung dieses Zeitintervalls deutete also auf einen Anstieg der PKA hin, eine Verlängerung auf einen Abfall.

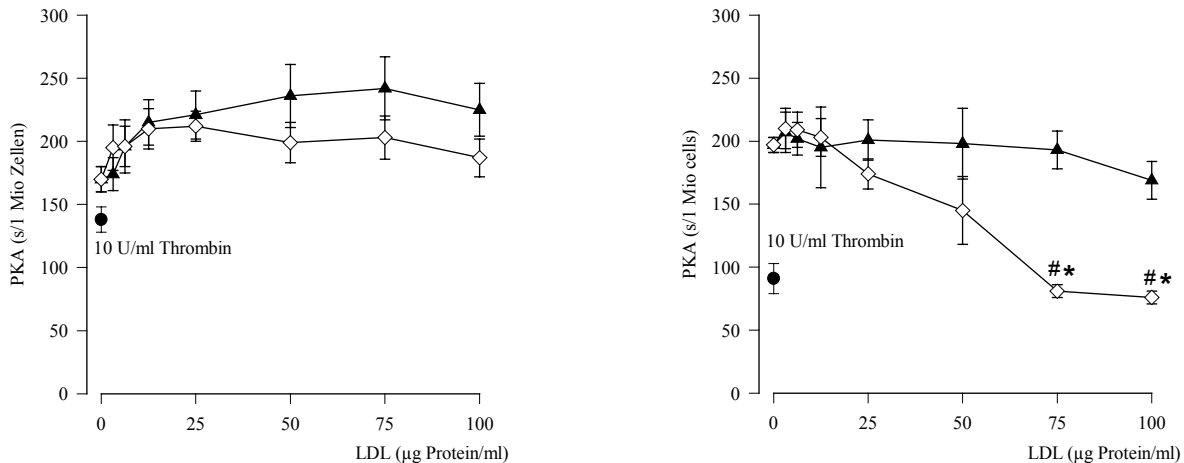
Mit n-LDL inkubierte mikrovaskuläre Endothelzellen zeigten im LDL Proteinkonzentrationsbereich von 3 - 100 µg/ml gegenüber den unbehandelten Kontrollen einen leichten Abfall der

PKA-Aktivität von  $170 \pm 10$  s/1 Mio Zellen auf maximal  $234 \pm 16$  s/1 Mio Zellen ( $p < 0,05$ ). Die PKA unter der Inkubation mit 3 - 100  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL änderte sich nicht signifikant gegenüber Inkubation mit n-LDL und unbehandelten Kontrollen (Abbildung 3.6).

Bei makrovaskulären koronaren Endothelzellen blieben im Proteinkonzentrationsbereich von 3 - 100  $\mu\text{g/ml}$  n-LDL die PKA Meßwerte gegenüber den unbehandelten Kontrollen unverändert.

Inkubation mit 3 - 12,5  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL induzierte keine signifikanten Unterschiede gegenüber den PKA Werten unter n-LDL und Kontrollbedingungen. Bei höheren Konzentrationen (25 - 100  $\mu\text{g/ml}$ ) von ox-LDL wurde ein signifikanter Anstieg der PKA ( $p < 0,05$ ) induziert. Maximal wurden bei 100  $\mu\text{g/ml}$  LDL-Protein  $76 \pm 5$  s gegenüber einem Kontrollwert von  $200 \pm 6$  s gemessen.

Die bei unbehandelten mikro- und makrovaskulären Endothelzellkulturen gemessenen PKA Werte waren nicht unterschiedlich ( $181 \pm 11$  s gegenüber  $200 \pm 6$  s). Inkubation der Zellkulturen mit Thrombin induzierte in beiden Zellarten einen Anstieg der PKA, der bei makrovaskulären koronaren Endothelzellen deutlicher ausgeprägt war (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Prokoagulante Aktivität mikrovasculärer Endothelzellen (a) und koronare Endothelzellen (b) unter Inkubation mit n-LDL (Dreiecke) und ox-LDL (Rauten). # =  $p < 0,05$  gegen Kontrollen, \* =  $p < 0,05$  gegen n-LDL

### 3.2.5 Wirkungen der LDL Fraktionen auf die Angiotensin Converting Enzyme Aktivität (ACE) mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen

Der Einfluß oxidierter LDL auf die ACE Aktivität mikro- und makrovaskulärer koronarer Endothelzellen wurde durch fluorometrische Bestimmung der Spaltung eines Tripeptids (HHL) bestimmt. Die Meßwerte für die ACE-Aktivität in beiden Zellarten ergaben, daß sowohl die Zugabe von n- als auch von ox-LDL keine signifikante Änderung der ACE-Aktivität induzierte: in Kulturen mikrovasculärer Endothelzellen wurden bei 100 µg/ml LDL n-LDL  $209 \pm 31$  mU/1Mio. Zellen und für ox-LDL  $238 \pm 56$  mU/1 Mio. Zellen gemessen. Die Kontrollwerte betrugen  $256 \pm 30$  mU/1 Mio. Zellen. In Kulturen makrovaskulärer koronarer Endothelzellen wurde bei 100 µg/ml LDL Protein für n-LDL eine ACE-Aktivität

von  $71 \pm 6$  mU/1 Mio. Zellen und für ox-LDL von  $87 \pm 7$  mU/1 Mio. Zellen bestimmt. Die Kontrollwerte unbehandelter Zellen betrugen  $76 \pm 5$  mU/1 Mio. Zellen.

Wie aus den Werten zu ersehen ist, war ACE-Aktivität der unbehandelten Kontrollen für mikrovaskuläre Endothelzellen deutlich höher als für makrovaskuläre koronare Endothelzellen ( $p < 0.05$ ).

Um zu überprüfen, ob die gemessene Enzymaktivität tatsächlich spezifisch für das ACE war, wurden Inhibitionsexperimente mit dem ACE-Hemmer Lisinopril ( $10^{-6}$  M) durchgeführt. Dabei konnte in Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen die ACE-Aktivität auf  $33 \pm 6$  mU/1 Mio. Zellen (12 %,  $p < 0,05$ ) und in Kulturen makrovaskulärer Zellen auf  $19 \pm 2$  mU/1 Mio. Zellen (25 %,  $p < 0,05$ ) gesenkt werden (siehe Tabelle 3.1).

	Kontrolle	Lisinopril ( $10^{-6}$ M)	n-LDL (100 µg/ml)	ox-LDL (100 µg/ml)
Koronare Endothelzellen	$76 \pm 5$ mU/ $10^6$ cells	$19 \pm 2$ mU/ $10^6$ . cells	$71 \pm 5$ mU/ $10^6$ . Cells	$87 \pm 7$ mU/ $10^6$ . Cells
Mikrovaskuläre Endothelzellen	$256 \pm 30$ mU/ $10^6$ Zellen	$33 \pm 6$ mU/ $10^6$ Zellen	$209 \pm 31$ mU/ $10^6$ Zellen	$238 \pm 6$ mU/ $10^6$ Zellen

**Tabelle 3.1:** ACE-Aktivität mikrovaskulärer und makrovaskulärer koronarer Endothelzellen. Die ACE Aktivität wurde mit Hilfe eines fluorimetrischen Assays nach Inkubation der Zellen mit n-LDL und ox-LDL bestimmt.

### 3.3 Diskussion der Ergebnisse

Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß oxidierte LDL die Sekretion koagulatorischer und fibrinolytischer Faktoren, die von Endothelzellen sezerniert werden, modulierten und so das koagulatorische Gleichgewicht in Richtung einer vermehrten Koagulation verschoben. Ferner zeigten die Ergebnisse erstmals, daß Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft, in diesem Fall aus makrovaskulären Koronararterien und der Mikrozirkulation des Herzens, unterschiedlich auf ox-LDL reagierten: vor allem makrovaskuläre koronare Endothelzellen reagierten auf Inkubation mit oxidierten LDL mit einem Anstieg der Sekretion koagulatorischer Faktoren, PAI-1 und Tissuefactor und einem Abfall der Sekretion des fibrinolytisch wirkenden t-PAs. Inkubation mikrovaskulärer Endothelzellen mit ox-LDL induzierte dagegen nur eine geringe Modulation dieser Faktoren.

Charakteristikum arteriosklerotischer Läsionen ist die Akkumulation von Cholesterin und Cholesterinestern in der Gefäßwand. Ursprung dieses Cholesterins sind die Plasmalipoproteine. Bei intaktem Endothel sind die interendotheliale Verbindungen zu dicht, um den Durchtritt von Proteinen, die größer als Albumin sind, zu zulassen. Da Lipoproteine ein Molekulargewicht haben, das größer als  $10^6$  Dalton ist ([119](#)), wandern die Lipoproteine in plasmalemmalen Vesikeln durch die Endothelzellschicht, ein Vorgang der als Transzytose bezeichnet wird ([215](#)). van Hinsbergh et al zeigten, daß dieser Vorgang nicht Rezeptor vermittelt und daher von der Konzentration der Lipoproteine im Blut abhängig ist ([246](#)). Dies bedeutet aber gleichzeitig, daß der Serumcholesterinspiegel als wesentliche, bestimmende Größe für die subendothelialen Cholesterineinlagerungen verantwortlich ist. Die Cholesterineinlagerungen induzieren eine Reaktion des Organismus, die durch die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten gekennzeichnet ist und zum Ziel hat, die Fetteinlagerungen der Gefäßwand abzubauen. Pathologisch anatomisch entspricht dieses Stadium dem „fatty streak“, das reversibel ist und in allen Lebensabschnitten beobachtet wird ([123](#)).



Die in engem Kontakt mit den umliegenden Zellen stehenden Lipoproteine werden innerhalb kurzer Zeit modifiziert ([42](#), [223](#)). Diese Modifikation der Lipoproteine ist durch das Auftreten oxidierter Epitope charakterisiert ([266](#)). Die Bedeutung des Auftretens oxidierter LDL konnte durch den Nachweis oxidierter LDL in arteriosklerotischen Läsionen und durch die positiven Wirkungen verschiedener Antioxidantien ([232](#)) bestärkt werden. Cyrus et al ([59](#)) zeigten kürzlich in einem Tiermodell mit apo E defizienten Mäusen, daß die Ausschaltung des 12/15-Lipoxygenase Gens in Makrophagen, eines Enzyms, das als ein LDL modifizierendes Enzym betrachtet wird ([131](#)), die Bildung oxidierter Lipoproteine und die Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen stark verminderte. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung der Lipoxygenasen für die LDL Oxidation, und gleichzeitig die Bedeutung oxidativer Modifikation der Lipoproteine für die Ausbildung arteriosklerotischer Plaques.

Die biologischen Wirkungen oxidierter LDL induzieren eine komplexe Veränderung der Genexpression, die neben hemmenden auch stimulierende Wirkungen zeigten. Die stimulierenden Wirkungen manifestieren sich u.a. in den durch ox-LDL induzierten proinflammatorischen Effekten, z.B. der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen ([57](#), [196](#)) und der Expression von Adhäsionsmolekülen ([128](#), [156](#), [212](#)). Diese proinflammatorischen Effekte sind besonders für Endothelzellen gut belegt und führen letztlich zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten, vor allem Monozyten und Lymphozyten, im Bereich der arteriosklerotischen Läsionen ([164](#)).

Als weiterer Wirkungsschwerpunkt oxidierter Lipoproteine auf Endothelzellen sind ihre Wirkungen auf die Sekretion prokoagulatorischer und fibrinolytischer Gerinnungsfaktoren zu erwähnen. Bei Patienten mit Arteriosklerose wurde eine verminderte fibrinolytische Kapazität nachgewiesen ([56](#)), die *in vitro* mit einer gesteigerten Aktivität des Plasminogen Aktivator Inhibitors 1 (PAI-1) einhergeht ([95](#), [180](#)). Auch *in vitro* konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden, daß Endothelzellen unter Inkubation mit oxidierten LDL vermehrt prokoagulatorische Faktoren wie PAI-1 ([238](#)) und Tissuefactor ([61](#), [66](#)) und vermindert fibrinolytische Faktoren wie t-PA ([130](#)) und NO ([74](#)) bilden.

Die geschilderten Befunde zeigen die Bedeutung oxidierter LDL für verschiedene zelluläre

Funktionen auf. Alle diese Untersuchungen wurden in Tiermodellen oder mit Endothelzellen aus Nabelschnurvenen durchgeführt. Es war jedoch nicht bekannt, wie Zellen aus der menschlichen koronaren Zirkulation auf ox-LDL reagieren würden. Das Fehlen dieser Befunde bildete den Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Untersuchungen.

Die mit kardialen Endothelzellen durchgeführten Untersuchungen zeigten überraschenderweise eine unterschiedliche Reaktion makro- und mikrovaskulärer Endothelzellen menschlicher Herzen auf oxidierte LDL. Dabei wurden vor allem in makrovaskulären koronaren Endothelzellen Zellfunktionen empfindlicher von ox-LDL moduliert als in mikrovaskulären Endothelzellen. Koronare makrovaskuläre Endothelzellen reagierten mit einer Steigerung der PAI-1 Sekretion und Hemmung der t-PA Sekretion, während beide Funktionen in mikrovaskulären koronaren Endothelzellen nur gering beeinflusst wurden. Diese mit makrovaskulären Endothelzellen gewonnenen Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren, die ähnliche Ergebnisse mit Endothelzellen aus Nabelschnurvenen erzielt hatten ([130](#), [136](#), [140](#), [238](#)). Die geringe Reaktion mikrovaskulärer Endothelzellen, die unter identischen Bedingungen kultiviert worden waren ist dagegen ein neuer interessanter Befund, der unterstreicht, daß die Herkunft der Endothelzellen ein wesentlicher Faktor ist, der bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten ist.

Neben der Veränderung der PAI-1 und der t-PA Sekretion wurde in koronaren makrovaskulären Endothelzellen die Bildung des prokoagulatorisch wirkenden Tissuefactors induziert. Tissuefactor ist ein transmembranäres Glykoprotein, das von Endothelzellen exprimiert wird und eine zentrale Rolle in der Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade spielt ([23](#)). Eine gesteigerte Bildung von Tissuefactor in makrovaskulären koronaren Endothelzellen ist ein weiterer Faktor, der neben t-PA und PAI-1 die koagulatorische Homöostase unter Einwirkung oxidierter Lipoproteine verändert. Die durch ox-LDL induzierte Änderung der Tissuefactor Bildung entsprach quantitativ den Veränderungen, die von anderen Autoren nach Stimulation mit TNF $\alpha$  beobachtet ([23](#), [39](#)). Im Unterschied zu Thrombin, das in beiden Zellarten eine Steigerung der Tissuefactorbildung induzierte und als Positivkontrolle eingesetzt wurde, blieben bei Inkubation mit ox-LDL die Effekte auf makrovaskuläre Endothelzellen beschränkt. Die in den hier durchgeführten Versuchen gezeigte präferentielle Veränderung koagulatorischer Endothelfunktionen makrovaskulärer koronarer Endothelzellen im Vergleich zu mikrovaskulären Endothelzellen

legt die Vermutung nahe, daß ihre gerinnungsaktiven Faktoren im Vergleich zu mikrovaskulären Endothelzellen besonders empfindlich reguliert werden.

Um zu untersuchen, ob die von ox-LDL ausgeübten Wirkungen zu einer allgemeinen Veränderung der Zellfunktion führten oder auf die untersuchten gerinnungsaktiven Faktoren beschränkt blieben, wurden Versuche durchgeführt, in denen als nicht koagulatorische Funktion die ACE-Aktivität der Endothelzellen unter Inkubation mit ox-LDL gemessen wurde. Die ACE-Aktivität blieb nach Inkubation mit n- oder ox-LDL unverändert, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Wirkungen des ox-LDL auf die gemessenen Gerinnungsfunktionen beschränkt blieben. Interessanterweise war jedoch die ACE Grundaktivität der mikrovaskulären Endothelzellen 3,3-fach höher als die der makrovaskulären koronaren Endothelzellen. Auch andere Autoren hatten bereits gezeigt, daß die ACE Aktivität im Bereich der Mikrozirkulation des Schweines größer ist als in Bereich der großen Gefäße (67).

Vielfältige Befunde zeigen, daß es bereits Hinweise über Unterschiede endothelialer Funktionen in den verschiedenen Gefäßbereichen und Organen gab. Als morphologische Unterschiede kann die Expression organspezifischer Antigene (11), die Expression unterschiedlicher Zelloberflächenmarker auf Endothelzellen in verschiedenen Bereichen der Mikrozirkulation (218) und die differentielle Expression des MECA79 Antigens in den verschiedenen Bereichen des Immunsystems (18) genannt werden. Neben diesen morphologischen Unterschieden ist auch eine Reihe funktionell unterschiedlicher Reaktionsweisen der Endothelzellen beschrieben worden. Beim Rind zeigten Arterien des Herzens, der Niere und des Schwanzes eine unterschiedlich Rezeptor abhängige Reaktion auf Bradykinin (10). Andere Autoren beschrieben, daß Gefäße aus dem gleichen Organ, aber verschiedenen Gefäßregionen, unterschiedlich auf chronische Druckbelastung reagierten: Banding der Aorta induzierte eine Dysfunktion des Koronarendothels, während das Endothel der Mikrogefäße des Koronarkreislaufs nicht betroffen war (77).

Kürzlich wurden auf Endothelzellen spezifische Rezeptoren für ox-LDL (LOX-1) nachgewiesen ([209](#)), die aufgrund ihrer Struktur zur Rezeptorklasse der Lectinfamilie gerechnet werden. Sie unterscheiden sich von den Scavenger Rezeptoren der Macrophagen, da acetyliertes LDL, das typischerweise durch die Scavenger-Rezeptoren aufgenommen wird, nicht vom LOX-1 Rezeptor gebunden wird ([162](#)). Während die Regulation des Rezeptors bereits untersucht wurde ([132](#), [161](#)), ist über die intrazellulären Signaltransduktionswege des LOX-1 Rezeptors bisher nichts bekannt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß für die Beurteilung der Wirkung oxidiertem LDL auf Endothelzellen eine differenziertere Betrachtungsweise als sie üblicherweise praktiziert wird, notwendig ist. Die hier durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß es nicht ausreichend ist, allgemein von Wirkungen oxidiertem LDL auf Endothelzellen zu sprechen, sondern es sind lokale und zelluläre Faktoren mit in die Betrachtungsweise einzubeziehen. Ähnliches gilt auch für den Vergleich tierischer Modelle mit dem menschlichen System, bei dem sogar größere Abweichungen als die hier aufgezeigten auftreten können. Als Beispiel sei hier das Vorhandensein des L-Selectin Liganden GlyCAM-1 genannt, der in Nagern und Rindern nachweisbar ist, jedoch bisher nicht im Menschen gefunden wurde ([94](#), [135](#), [236](#)). Auch für die Beurteilung der Wirkungen einer ACE-Aktivität inhibierenden Therapie hatten sich aus dem Unterschied der Expression von Chymase und ACE im Rattenherzen und im menschlichen Herzen ([243](#), [244](#)) Fehlbeurteilungen ergeben.

Neben einer differenzierteren Beurteilung der pathophysiologischen Wirkung oxidiertem LDL auf Endothelzellen, können die Befunde auch dazu beitragen, das Verständnis für die präferentielle Lokalisation von arteriosklerotischen Läsionen in großen, makrovaskulären Gefäßbereichen zu verstehen. Die klinische Erfahrung, daß das Auftreten von Gefäßläsionen und Gefäßthrombosen vor allem in großen Gefäßen beobachtet wird ([154](#), [200](#)), kann damit z.T. auch auf lokale Faktoren der Gefäßwand zurückgeführt werden und durch diese neuen *in vitro* Befunde ein besseres Verständnis finden.

Die unterschiedliche Reaktionsweise mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen auf ox-LDL ist neben einem pathophysiologisch wichtigem Befund eine Bestätigung dafür, daß die als mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen isolierten Zellen tatsächlich aus unterschiedlichen Gefäßarealen stammen.

## **4 Untersuchungen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und der Adhäsion von Leukozyten auf kardialen Endothelzellen**

### **4.1 Einleitung**

Sowohl tierexperimentelle Untersuchungen als auch Untersuchungen menschlicher arteriosklerotischer Gefäße haben gezeigt, daß die Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten am Endothel im Bereich von subendothelialen Cholesterinablagerungen und die nachfolgende Einwanderung der anhaftenden Leukozyten in den subendothelialen Raum charakteristische Befunde früher arteriosklerotischer Läsionen darstellen ([58](#), [200](#)). Grundlage jeder Leukozyten-Endothel-Adhäsion sind Oberflächenproteine beider Zellen, die durch Interaktionen zu einer Haftung der Leukozyten am Endothel führen.

E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 sind Adhäsionsmoleküle, die die Interaktion und Adhäsion von Monozyten mit dem Endothel vermitteln und daher eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose spielen ([64](#), [98](#), [201](#)). VCAM-1 und ICAM-1 gehören zur Familie der Immunglobulin-ähnlichen Adhäsionsmoleküle und konnten auf Endothelzellen im Bereich arteriosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden ([178](#), [179](#), [245](#)). VCAM-1 und ICAM-1 interagieren mit den leukozytären Adhäsionsrezeptoren VLA-4 (CD49d/CD29) bzw. LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) ([22](#), [220](#)). E-Selectin, das ebenfalls in arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen wurde ([179](#)), gehört neben P- und L-Selectin zur Gruppe der Selectine und wird nur auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. Es interagiert mit sialyl Lewis<sup>x</sup> haltigen Liganden auf neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten ([137](#), [169](#), [222](#), [248](#)).

Neben Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) können auch aktivierte T-Zellen und Thrombozyten über das CD40 - CD40 Ligand System Endothelzellen aktivieren ([104](#)). CD40 ist ein transmembranäres Glykoprotein, das aufgrund seiner

strukturellen Ähnlichkeit zur Gruppe der TNF-Rezeptorfamilie gerechnet wird. Zu dieser Gruppe werden unter anderem die beiden TNF-Rezeptoren TNF1- und TNF2-Rezeptor und der CD95 oder Fas Rezeptor gezählt ([17](#), [21](#)). CD40 wurde zunächst auf Lymphozyten beschrieben und steuert dort die B-Zellaktivierung und klonale Expansion nach Antigen Kontakt ([49](#)). Es hat weiterhin einen wesentlichen Anteil bei der Umschaltung der Antikörperbildung vom Typ IgM zum Typ IgG ([125](#)). Neben B-Lymphozyten wird CD40 auch auf vaskulären Fibroblasten ([70](#)), Endothelzellen ([109](#)) und nach Stimulation mit Zytokinen auch auf glatten Muskelzellen exprimiert ([110](#)). Stimulation des CD40 Rezeptors aktiviert Endothelzellen ähnlich wie Stimulation über den TNF $\alpha$  Rezeptor und führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen und Sekretion von Chemokinen ([122](#)).

Der Ligand des CD40 Rezeptors ist ein TNF-ähnliches Glykoprotein von ca. 33 KDa. CD40-Ligand (CD154, TRAP) wird auf aktivierten T-Lymphozyten und aktivierten Plättchen exprimiert ([104](#)). Interaktionen von CD40 mit CD40 Ligand werden als ein wesentlicher pathogenetischer Mechanismus bei der Transplantatvaskulopathie angenommen ([134](#)).

Klinische Studien haben eine Verbindung zwischen der Aktivität des Renin-Angiotensin Systems (RAS) und dem Auftreten ischämischer Ereignisse belegt ([32](#), [38](#)). Studien mit ACE-Hemmern zeigten deren protektiven Effekt für das kardiovaskuläre System ([3](#), [183](#)). Die dieser Beobachtung zugrundeliegenden Mechanismen werden aber noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, daß zusätzliche Interaktionen des RAS und der Gefäßwand bestehen, die über eine Beeinflussung des Gefäßtonus und des Blutdrucks hinausgehen. Da Endothel Leukozyten Wechselwirkungen wesentlich den Verlauf der Arteriosklerose bestimmen, könnte das RAS diese Wechselwirkungen auf Seiten der Endothelzellen oder der Leukozyten beeinflussen.

Interaktionen der CD40 tragenden Endothelzellen mit CD40 Ligand positiven Zellen auf der einen Seite sowie die Komponenten des Renin Angiotensin Systems könnten die Pathologie der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen modulierend beeinflussen, indem sie proinflammatorische oder anti-inflammatorische Wirkungen ausüben. Der Einfluss dieser beiden Systeme ist jedoch in Hinblick auf die Pathogenese der Arteriosklerose in einem mensch-

lichen System bisher nicht untersucht worden, so daß die Wertigkeit unklar bleibt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher in einem *in vitro* Modell mit Zellen aus menschlichen Koronararterien die Wirkungen des Angiotensin II und des CD40 Liganden auf entzündliche Komponenten in der Pathogenese der Arteriosklerose charakterisiert. Vergleichend wurden Endothelzellen aus der Mikrozirkulation des Herzens, also aus einem Gefäßbereich, in dem normalerweise keine arteriosklerotischen Läsionen beobachtet werden, untersucht.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 *Charakterisierung der Expression von Adhäsionsmolekülen und ihrer mRNA in kardialen Endothelzellen*

Die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 auf der Zelloberfläche wurde mit Hilfe eines Zell-ELISA bestimmt. Dabei wurde die Bindung der spezifischen Antikörper an der Zelloberfläche mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht und photometrisch bestimmt. Die gemessene Extinktion (ausgedrückt in relativen Einheiten) war dabei proportional zu der Menge der an der Zelloberfläche exprimierten Adhäsionsmoleküle.

Die mRNA der Adhäsionsmoleküle wurde durch RT-PCR ermittelt. Die Menge der spezifischen mRNA wurde als Verhältnis zu der mRNA eines konstant exprimierten Gens, der Pyruvatdehydrogenase (PDH), ausgedrückt.

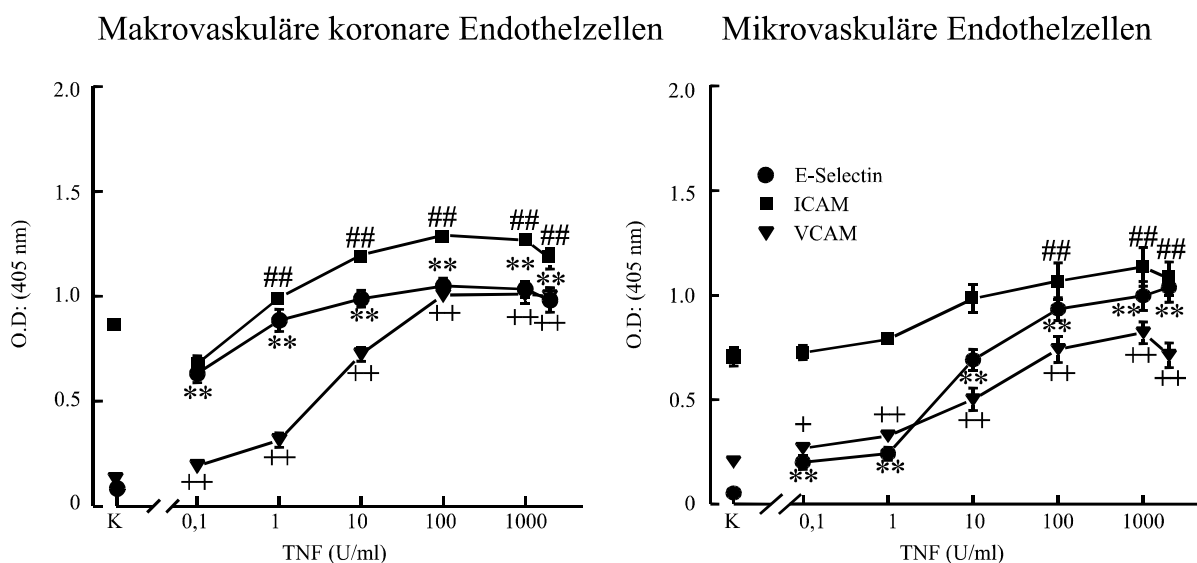
#### 4.2.1.1 Expression von Adhäsionsmolekülen nach Stimulation mit TNF $\alpha$

Die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle wurde vergleichend auf mikro- und makrovaskulären koronaren Endothelzellen durchgeführt, um Unterschiede dieser beiden Zellarten in der Regulation der Adhäsionsmoleküle zu erkennen. Die mRNA der Adhäsionsmoleküle wurde nur in makrovaskulären koronaren Endothelzellen untersucht. Sowohl mikro- als auch makrovaskuläre koronare Endothelzellen exprimierten unter Kontrollbedingungen kein E-Selectin und VCAM-1. ICAM-1 wurde dagegen bereits von nicht stimulierten Zellen exprimiert. Inkubation mit TNF $\alpha$  (0,1 – 10 000 U/ml) induzierte in beiden Zellarten eine konzentrationsabhängige vermehrte Expression aller drei Adhäsionsmoleküle. Es zeigte sich jedoch, daß E-Selectin in makrovaskulären koronaren Endothelzellen bei geringeren Konzentrationen von TNF $\alpha$  eine halbmaximale Expression induzierte. Die halbmaximale



Stimulation für E-Selectin wurde bei makrovaskulären koronaren Endothelzellen mit 0,1 U/ml  $\text{TNF}\alpha$  und bei mikrovaskulären Endothelzellen bei 6,3 U/ml  $\text{TNF}\alpha$  beobachtet (Abbildung 4.1).

Betrachtet man den Zeitgang der Expression, so zeigte sich, daß nach 4 Stunden E-Selectin und nach 8 Stunden VCAM-1 eine maximale Expression aufwies, während die Expression von ICAM-1 nach 4 Stunden erhöhte Werte gegenüber nicht stimulierten Zellen aufwies, die über 24 Stunden noch weiter anstiegen.

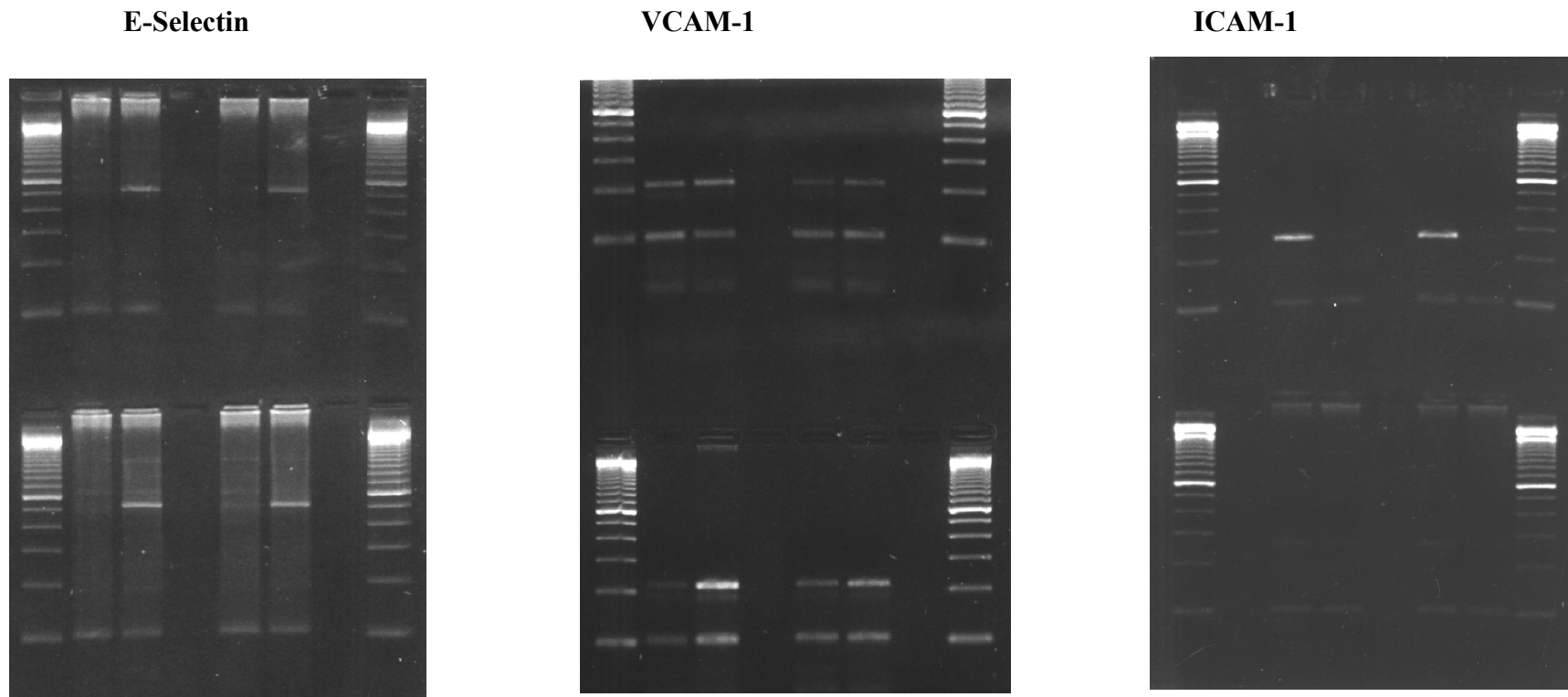


**Abbildung 4.1:** Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 auf makrovaskulären und mikrovaskulären kardialen Endothelzellen. Die Zellen wurden 4 h (E-Selectin), 12 h (VCAM-1) oder 24 h (ICAM-1) mit  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert und die Expression der Adhäsionsmoleküle mit einem Zell-ELISA quantifiziert. (n = 12, \*, +, # = p<0,05; \*\*, ++, ## = p < 0,01).

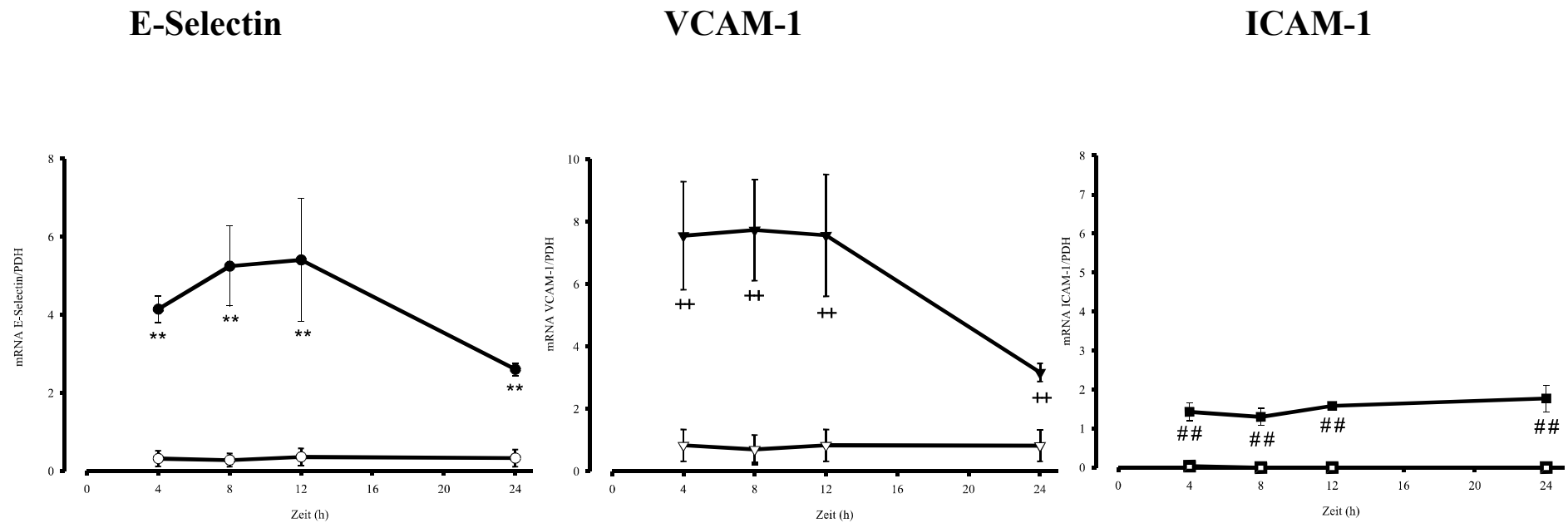
Die Analyse der mRNA in makrovaskulären koronaren Endothelzellen bestätigte und ergänzte die mit Hilfe des Zell-ELISA gefundenen Daten. In nicht stimulierten Zellen konnte keine VCAM-1 und E-Selectin mRNA nachgewiesen werden. Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (1000 U/ml) induzierte einen starken Anstieg der jeweiligen mRNA mit einem Maximum bei ca. 4-8 Stunden und einem danach folgenden Abfall der mRNA. mRNA für ICAM-1 fand sich bereits in unstimulierten Zellen und stieg unter Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  nur gering an.

Zusammenfassend ergibt sich, daß  $\text{TNF}\alpha$  in mikro- als auch in makrovaskulären Endothel-

zellen eine starke Zunahme der Proteinexpression und der mRNA aller drei untersuchten Adhäsionsmoleküle induzierte.



**Abbildung 4.2:** Duplex PCR für E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 und PDH als Standard. Es wurde jeweils die mRNA der Adhäsionsmoleküle in koronaren makrovaskulären Endothelzellen im Zeitverlauf von nicht stimulierten Zellen und von Zellen die über 4, 8, 12 und 24 Stunden mit 1000 U/ml TNF $\alpha$  stimuliert wurden, dargestellt.

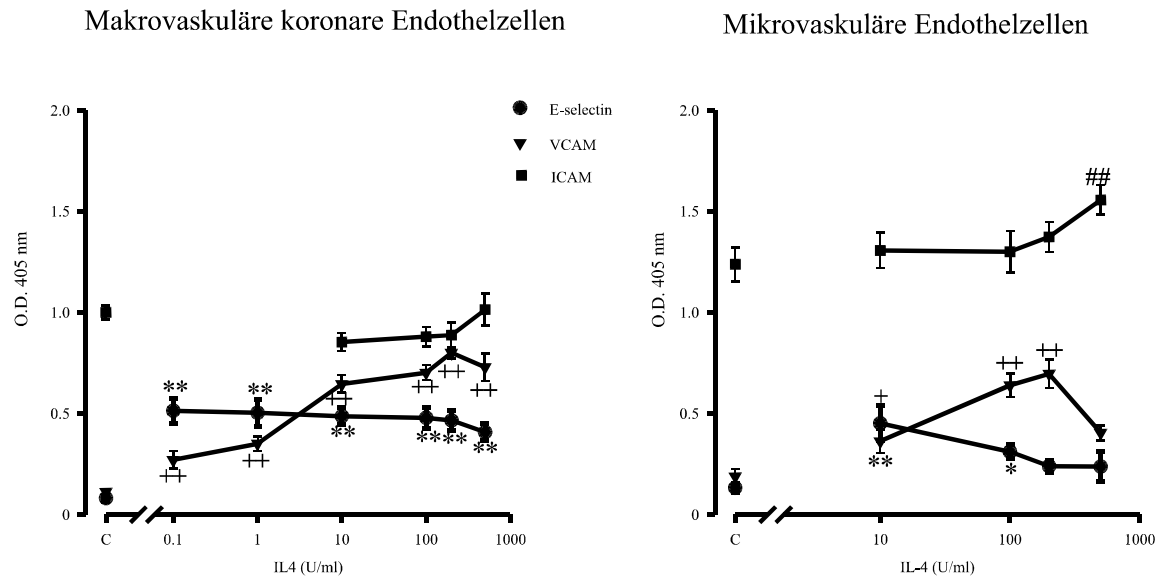


**Abbildung 4.3:** Duplex PCR für E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 mit PDH als Standard. Die PCR Produkte wurden durch HPLC quantifiziert. Die mRNA nichtstimulierter makrovaskulärer Endothelzellen (offene Symbole) und mit 1000 U/ml TNFα stimulierter Zellen (gefüllte Symbole) wurde im Zeitverlauf analysiert und vergleichend dargestellt (n=3). \*\*, ++, ## =  $p < 0,01$ .

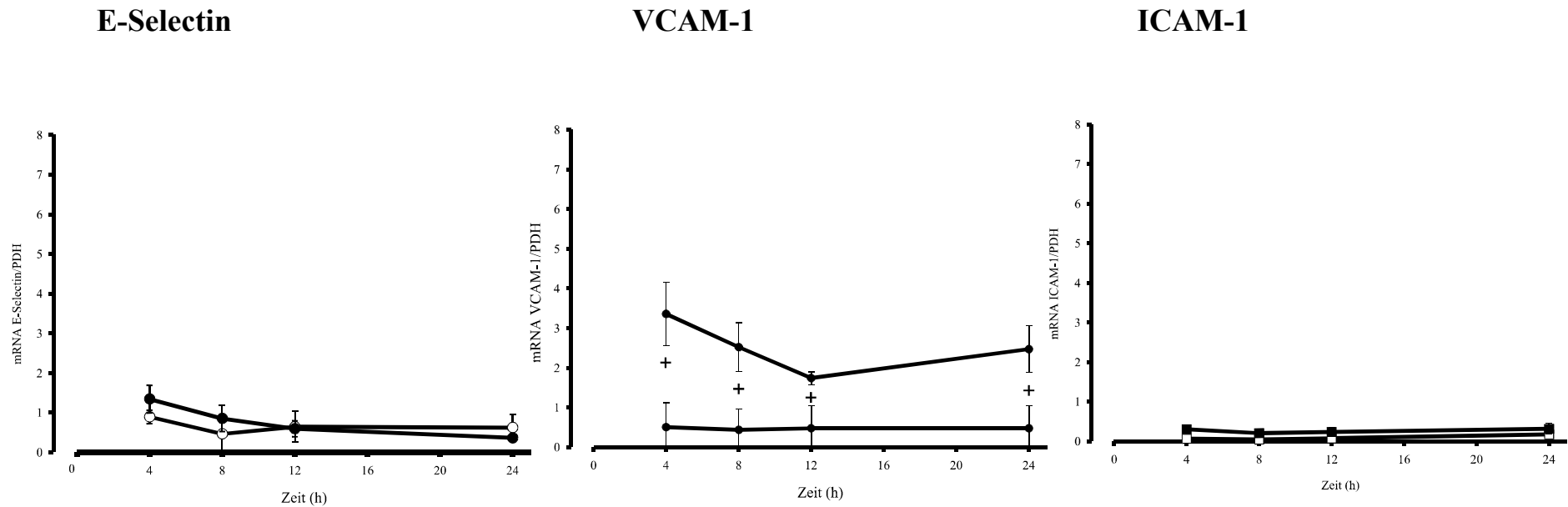
#### **4.2.1.2 Expression von Adhäsionsmolekülen nach Stimulation mit IL4**

Inkubation mikrovaskulärer Endothelzellen mit IL-4 (0,1 - 500 U/ml) induzierte einen Anstieg der VCAM-1 Expression. In Kulturen makrovaskulärer koronarer Endothelzellen war dieser stimulierende Effekt durch IL-4 wesentlich deutlicher ausgeprägt und erreichte eine vergleichbare Wirkung wie  $\text{TNF}\alpha$ . Bei beiden Zellarten wurden maximale Effekte bei 200 U/ml IL-4 beobachtet, bei Konzentrationen  $> 10$  U/ml war die Konzentrations-Wirkungsbeziehung allerdings sehr flach. Die Expression von E-Selectin wurde in Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen nicht beeinflusst. In Kulturen makrovaskulärer koronarer Endothelzellen wurde über den gesamten Konzentrationsbereich eine leicht erhöhte E-Selectin Expression gemessen, die keine Abhängigkeit von der verwendeten IL-4 Konzentration zeigte. IL-4 hatte keinen signifikanten Einfluß auf die E-Selectin mRNA. Auch die ICAM-1 mRNA wurde durch IL-4 nicht signifikant moduliert. Die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche änderte sich in Kulturen makrovaskulärer koronarer Endothelzellen nicht; in Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen konnte nur bei der höchsten verwendeten Konzentration eine leichte Zunahme der Expression beobachtet werden (Abbildung 4.4 und 4.5).

Die Daten zeigen, daß IL-4 die Expression und mRNA von VCAM-1 erhöhte, die Expression und mRNA von E-Selectin und ICAM-1 jedoch nicht wesentlich beeinflusste.



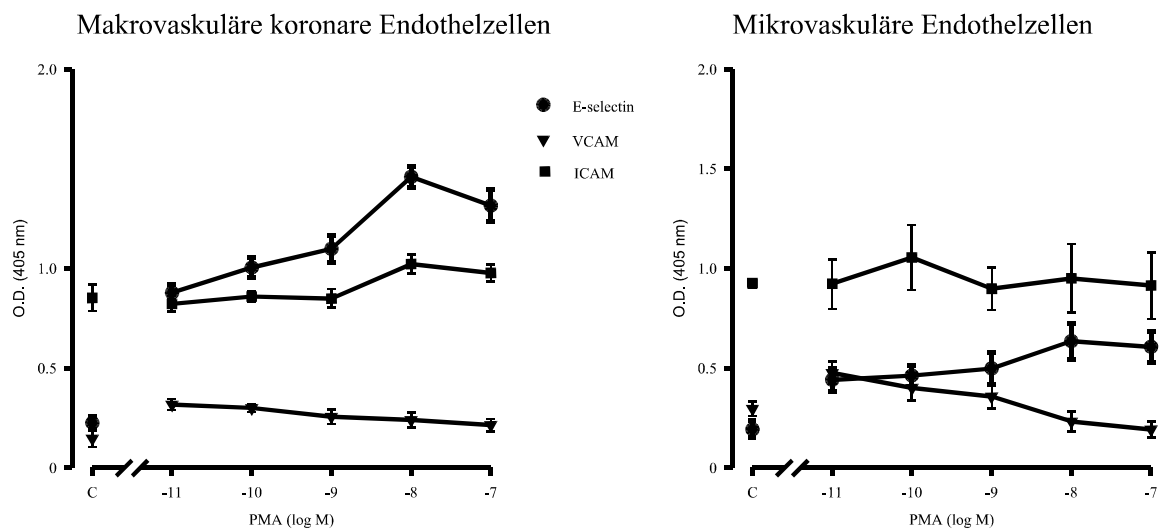
**Abbildung 4.4:** Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 auf mikrovaskulären und makrovaskulären koronaren Endothelzellen unter Stimulation mit IL-4. Die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle wurde mit einem Zell-ELISA gemessen. (n=5, \*, #, + = p<0,05, \*\*, ++, ## = p<0,01)



**Abbildung 4.5:** Makrovaskuläre koronare Endothelzellen wurden mit IL-4 (200 U/ml) über 24 h stimuliert und die mRNA der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 in einer Duplex-PCR mit PDH als Standard zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. (n=3, + = p<0,05)

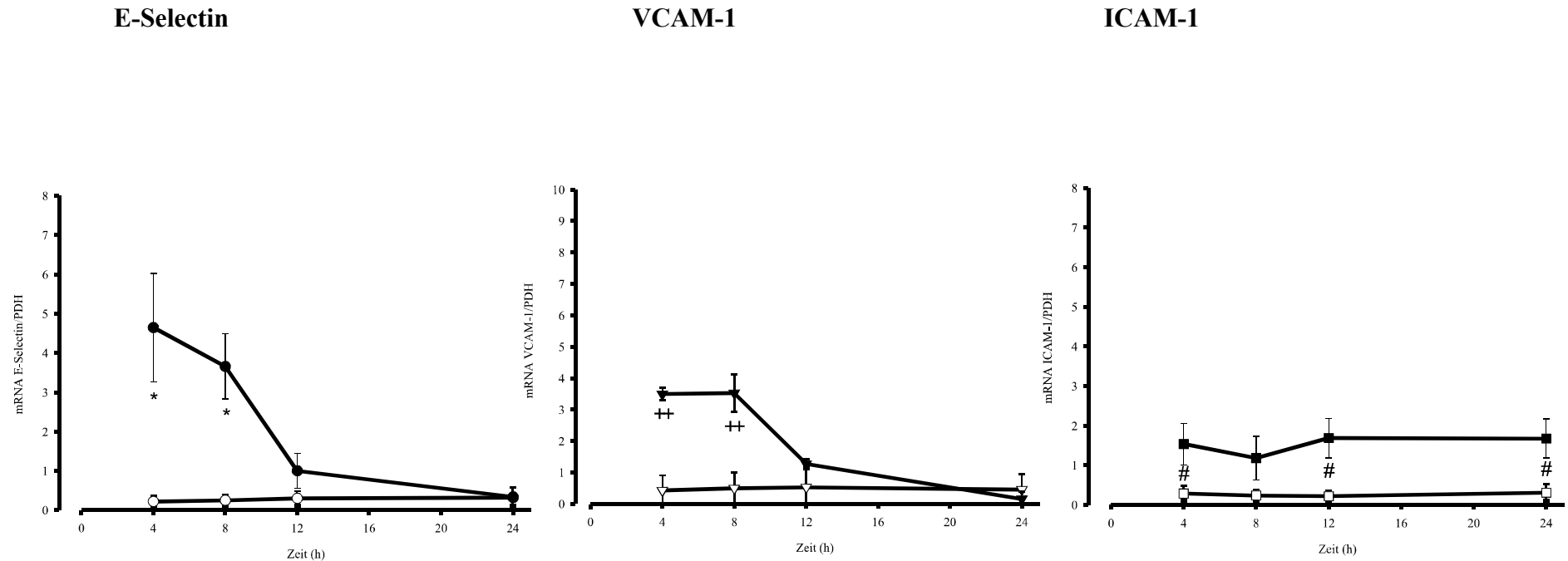
#### 4.2.1.3 Expression von Adhäsionsmolekülen nach Stimulation mit Phorbol ester

Phorbol ester (PMA,  $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) induzierte in Kulturen mikro- und makrovaskulärer koronarer Endothelzellen einen Anstieg der E-Selectin Expression mit maximalen Effekten bei ca.  $10^{-8}$  M. Die Effekte auf makrovaskulären koronaren Endothelzellen waren ausgeprägter als auf mikrovaskulären Endothelzellen. Die VCAM-1 Expression war bei den niedrigsten Konzentrationen von PMA leicht erhöht und bei zunehmenden Phorbol esterkonzentrationen rückläufig. Die ICAM-1 Expression wurde nicht moduliert. Die bestimmten relativen mRNA Konzentrationen in makrovaskulären koronaren Endothelzellen zeigten ebenfalls eine leichte Stimulation für VCAM-1, dagegen eine deutliche Zunahme der E-Selectin mRNA. Die Daten legen nahe, daß Phorbol ester die Expression und mRNA von E-Selectin und VCAM-1 erhöht, die von VCAM-1 jedoch nur bei niedrigen Konzentrationen.



**Abbildung 4.6:** Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 nach Stimulation mit Phorbol ester (PMA,  $10^{-11}$  –  $10^{-7}$  M). Die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzelloberfläche wurde mit Hilfe eines Zell-ELISA bestimmt. (n=5, \*,#,+=p<0,05, \*\*,++,###=p<0,01)

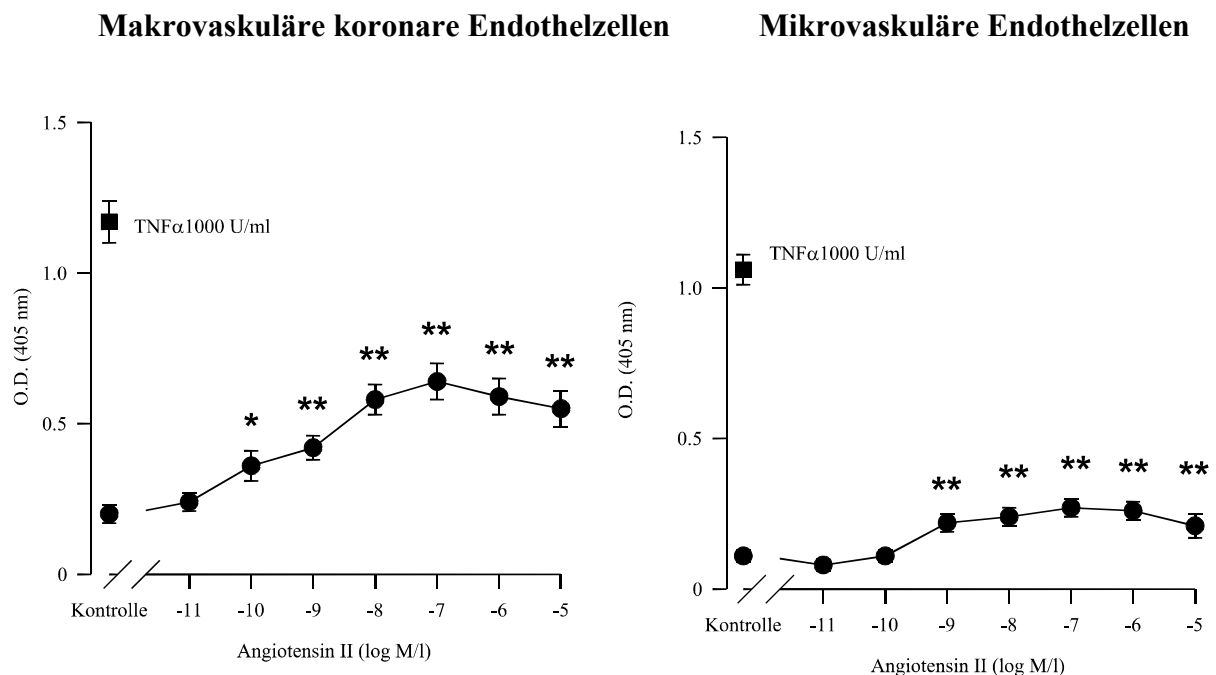




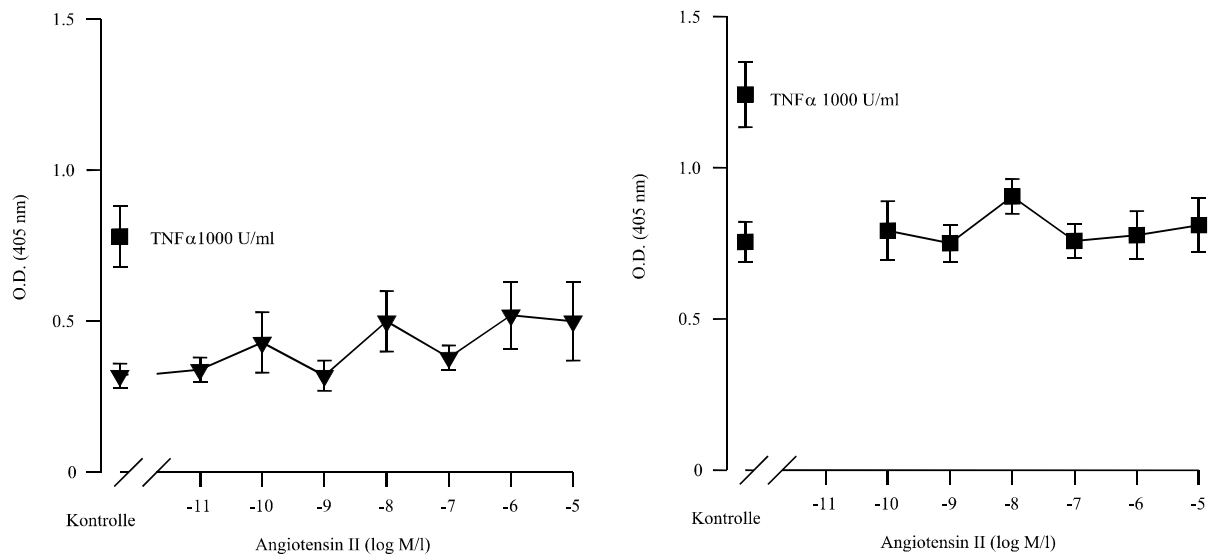
**Abbildung 4.7:** mRNA der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 nach Stimulation mit IL-4 (200 U/ml). Makrovaskuläre koronare Endothelzellen wurden mit Phorbol ester (PMA,  $10^{-8}$  M) über einen Zeitraum von 24 Stunden stimuliert und die mRNA der Adhäsionsmoleküle in einer Duplex-PCR mit PDH als Standard zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. (n=3, \*, +, # = p<0,05)

#### 4.2.1.4 Expression von Adhäsionsmolekülen nach Stimulation mit Angiotensin II

Stimulation makrovaskulärer koronarer Endothelzellen mit Angiotensin II ( $10^{-11}$  –  $10^{-5}$  M) induzierte eine vermehrte Expression von E-Selectin, während VCAM-1 und ICAM-1 nicht in ihrer Expression verändert wurden. Maximale Effekte wurden bei  $10^{-7}$  M Angiotensin II beobachtet und erreichten 55% der maximal durch  $\text{TNF}\alpha$  induzierten Effekte. Auf mikrovaskulären Endothelzellen wurde ein ähnlicher stimulierender Effekt beobachtet, der jedoch deutlich geringer ausgeprägt war. Auf die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 hatte Angiotensin II auch bei mikrovaskulären Endothelzellen keinen stimulierenden Effekt.

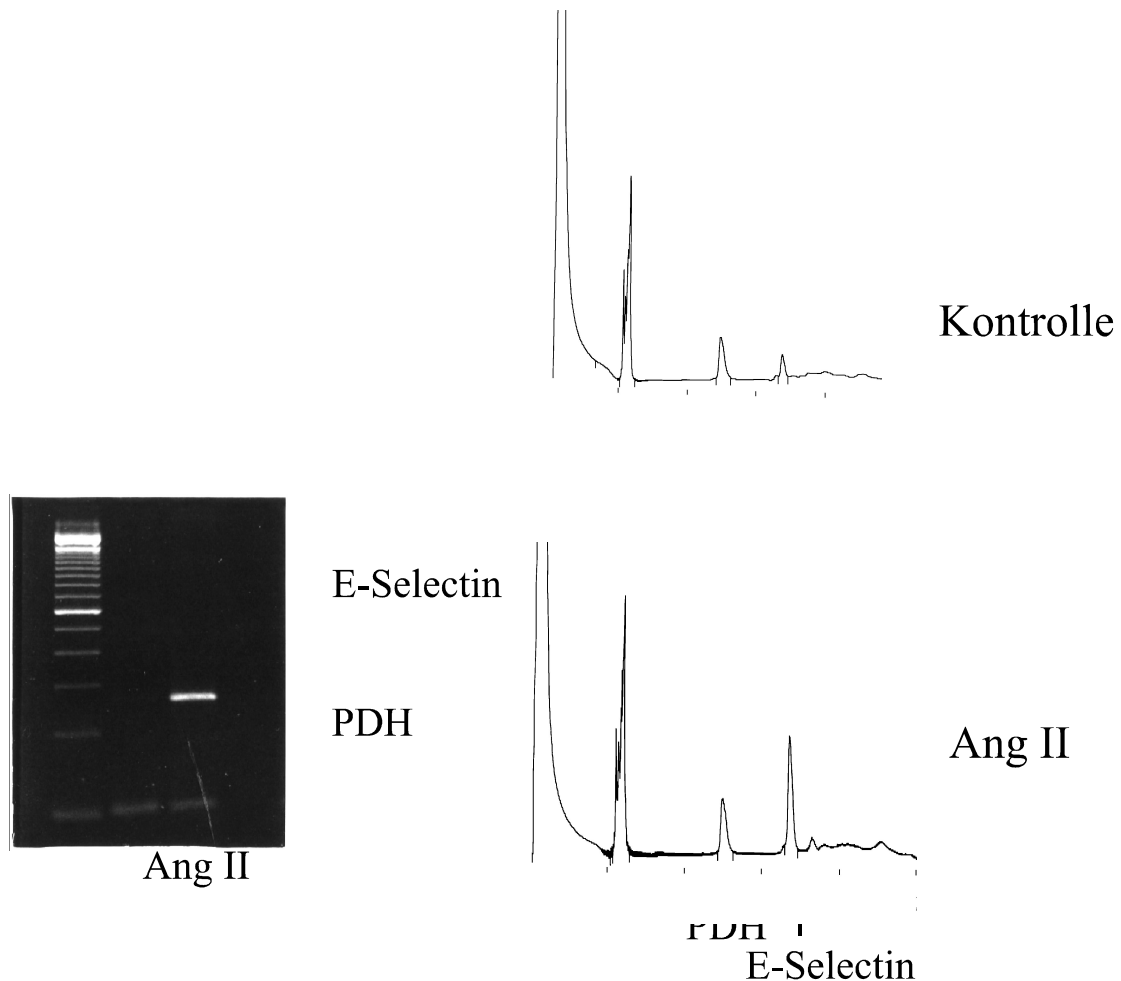


**Abbildung 4.8:** E-Selectin Expression auf mikro- und makrovaskulären Endothelzellen nach Stimulation mit Angiotensin II. Die Zellen wurden über 4 Stunden mit Angiotensin II stimuliert und anschließend mit Hilfe eines Zell-ELISA die Expression von E-Selectin bestimmt (n=4, \*=p<0,05, \*\*=p<0,01)



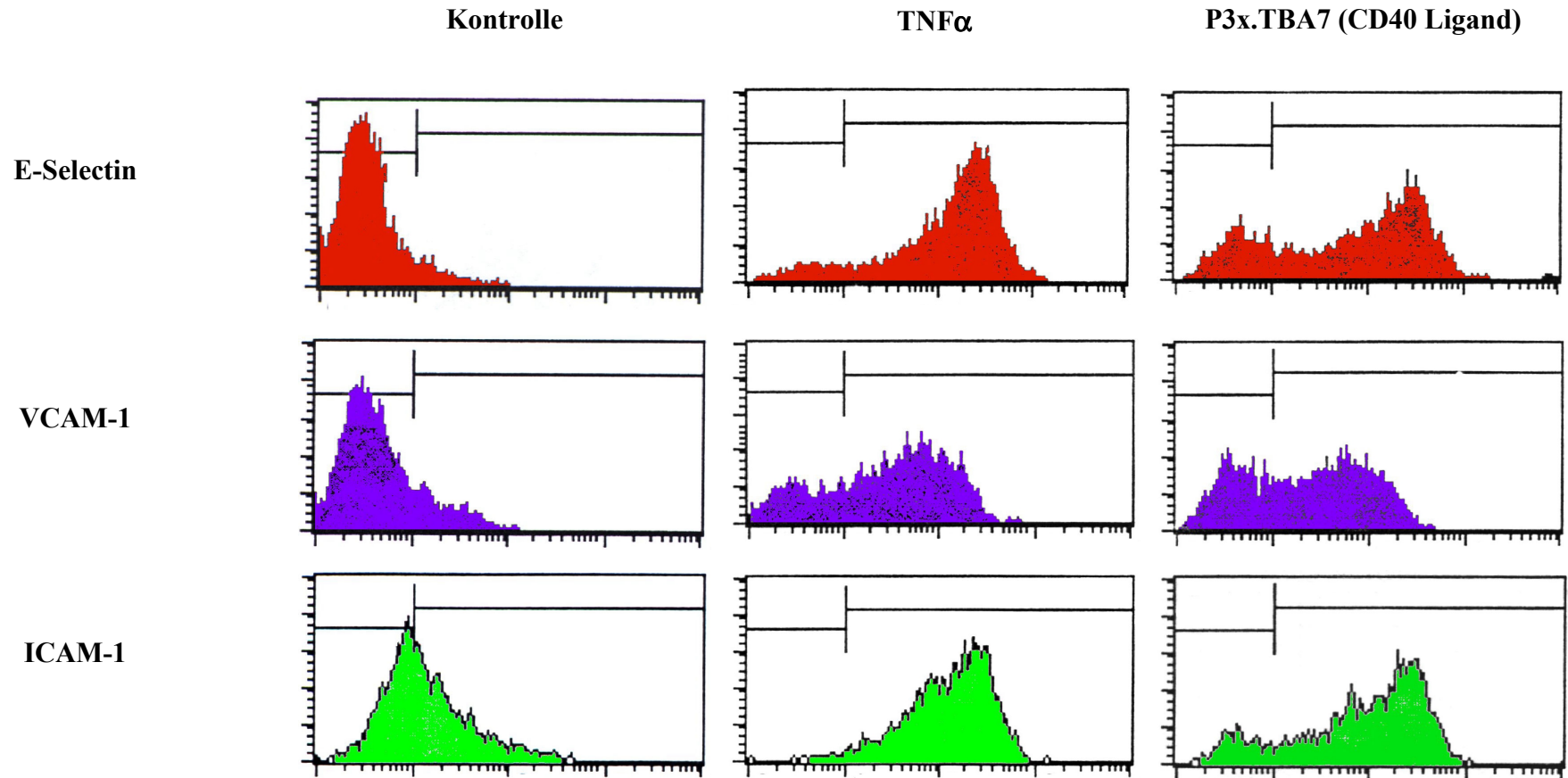
**Abbildung 4.9:** Nach Stimulation mit Angiotensin II über 4 Stunden wurde die Expression von VCAM-1 (Dreiecke) und ICAM-1 (Quadrate) untersucht. (n=5, \*=p<0,05, \*\*=p<0,01)

Analyse der korrespondierenden mRNA Ergebnisse zeigte (Abb. 4.10), daß Angiotensin II ( $10^{-7}$  M) die E-Selectin mRNA gegenüber unstimulierten Kontrollen vermehrte. Der Effekt war geringer ausgeprägt als bei Stimulation mit TNF $\alpha$ , zeigte aber bei 3 unabhängigen Versuchen bereits eine statistisch signifikante Erhöhung (p<0,05) der mRNA gegenüber nicht stimulierten Kontrollkulturen.



**Abbildung 4.10:** E-Selectin mRNA nach Stimulation mit Angiotensin II. Makrovaskuläre koronare Endothelzellen wurden über 4 Stunden mit Angiotensin II ( $10^{-7}$  M) stimuliert. Nach RNA Extraktion erfolgte eine Duplex PCR mit PDH als Standard. A) Agarose Gel der Amplifikationsprodukte. B) HPLC Chromatogramm der Amplifikationsprodukte

Angiotensin II induzierte in mikro- und makrovaskulären koronaren Endothelzellen einen Anstieg der E-Selectin Expression und E-Selectin mRNA, während die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 nicht moduliert wurde.



**Abbildung 4.11:** Stimulation von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen mit  $\text{TNF}\alpha$  und CD40 Ligand (CD154) über 4 Stunden. Die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 wurde nach Färbung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern im Durchflußzytometer analysiert ( $n = 3$ ).

#### **4.2.1.5 Expression von Adhäsionsmolekülen nach Stimulation mit CD40-Ligand**

Um die Wirkung einer Stimulation des CD40 Rezeptors von Endothelzellen zu untersuchen, wurden Endothelzellen mit einer Ziellinie, die durch Transfektion CD40 Ligand (CD154) exprimierte, P3x.TBA7, inkubiert. In Vorversuchen war eine Konzentration von ca.  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  als optimale Zellkonzentration ermittelt worden. Die P3x.TBA7 Zellen wurden mit 2% Paraformaldehyd fixiert, um parakrine Effekte auszuschließen. Als Negativkontrolle dienten CD154 negative Zellen, P3xWT, als Positivkontrolle wurde eine Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (500 U/ml) durchgeführt. Die Analyse der Adhäsionsmoleküle erfolgte mit einem Durchflußzytometer, da nach Beenden der Inkubation nicht alle CD154 positiven Zellen abgespült werden konnten und im Zell-ELISA mit den Signalen der Endothelzellen interferierten. Im Durchflußzytometer dagegen konnten, aufgrund der unterschiedlichen Zellgrößen, die verschiedenen Zellpopulationen getrennt werden.

Wie bereits im Zell-ELISA beobachtet, exprimierten nicht stimulierte Nabelschnurvenen Endothelzellen kein E-Selectin und VCAM-1 und geringe Mengen an ICAM-1. Nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  kam es zu einer vermehrten Expression aller drei Adhäsionsmoleküle. Auch Stimulation des CD40 Rezeptors induzierte eine vermehrte Expression von E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1. Sie war jedoch etwas geringer ausgeprägt als nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und erreichte 50 – 70% der  $\text{TNF}\alpha$  induzierten Expression. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 4.11. dargestellt.

#### ***4.2.2 Charakterisierung der Adhäsion von HL60 Zellen an kardialen Endothelzellen***

Die Adhäsion von HL60 und NALM6-L Zellen an mikrovaskulären Endothelzellen wurde in einem Adhäsionsassay untersucht. Dabei wurden Endothelzellen für 4 Stunden stimuliert und anschließend in eine Flußkammer gelegt. Es wurden HL60 Zellen mit einer konstanten Flußrate von 117  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer durch die Form der Flußkammer bedingten variablen Wand-

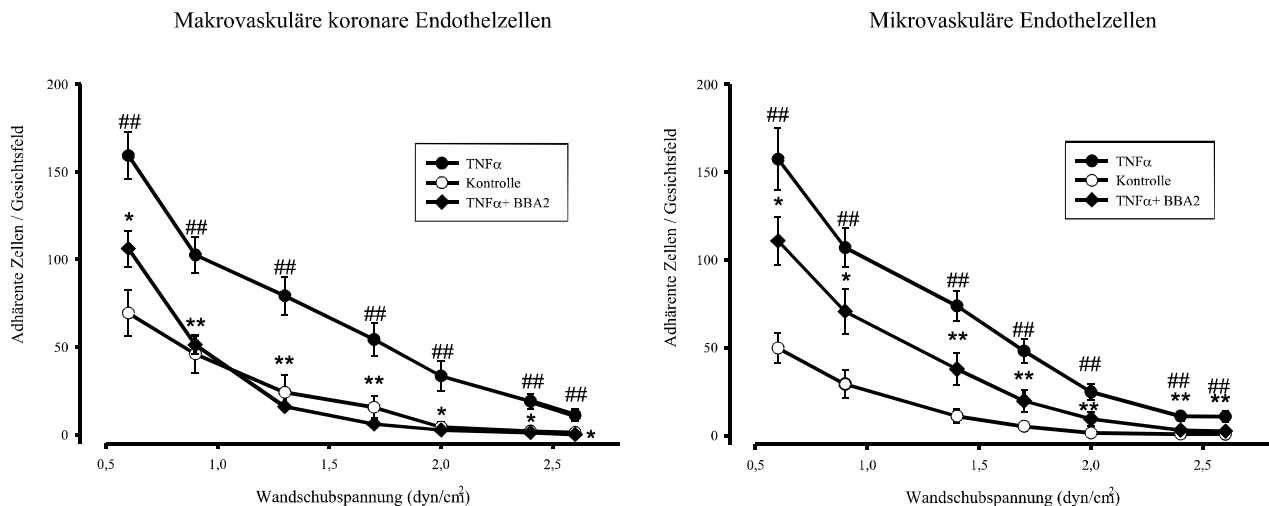
schubspannung von 0,6 - 2,6 dyne/cm<sup>2</sup> über die Zellen perfundiert. Die Zahl der adhärenierten Leukozyten wurde nach 5 Minuten pro Gesichtsfeld bei unterschiedlichen Wandschubspannungen ausgezählt. Dabei ist die Adhäsion in den Bereichen hoher Wandschubspannung (>1 dyne/cm<sup>2</sup>) Selectin abhängig, in den Bereichen niedriger Wandschubspannung dagegen Selectin unabhängig. Da in den Bereichen hoher Wandschubspannung nur wenige Zellen adhärenierten, wurden in einigen Versuchen die Zahlen der adhärenierten Zellen in drei Bereiche zusammengefaßt: 1) > 2 dyne/cm<sup>2</sup>, 2) 1-1.9 dyne/cm<sup>2</sup>, 3) < 1 dyne/cm<sup>2</sup>.

#### **4.2.2.1 Adhäsion von HL60 Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$**

Die Adhäsion von HL60 Zellen in Abhängigkeit der Wandschubspannung wurde an unstimulierten und TNF $\alpha$  stimulierten kardialen Endothelzellen untersucht.

In Vorversuchen mit HUVEC war die TNF $\alpha$  Konzentration ermittelt worden, bei der eine maximale Adhäsion der HL60 Zellen auftrat. Es wurden dazu die HUVEC mit 0.1 – 1000 U/ml TNF $\alpha$  stimuliert und die Adhäsion im Bereich hoher Wandschubspannung bestimmt. Es zeigte sich, daß an nicht stimulierten HUVEC nur vereinzelte HL60 Zellen adhärenierten. Bei zunehmenden Konzentrationen von TNF $\alpha$  kam es auch zu einer Zunahme der HL60 Adhäsion. Es wurden dabei maximale Effekte bei ca. 100 U/ml und eine halbmaximale Stimulation bei 2 U/ml beobachtet. Für die Versuche wurden daher 500 oder 1000 U/ml TNF $\alpha$  verwendet, um sicher zu stellen, daß eine maximale Stimulation erfolgte.

Wie bereits mit Endothelzellen aus Nabelschnurvenen beobachtet, induzierte TNF $\alpha$  bei mikro- und makrovaskulären koronaren Endothelzellen eine Zunahme der adhärenierenden HL60 Zellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Dabei adhärenierten in den Bereichen hoher Wandschubspannung (>1 dyne/cm<sup>2</sup>) weniger Zellen als in den Bereichen niedriger Wandschubspannung (<1 dyne/cm<sup>2</sup>). Bei nicht stimulierten Endothelzellen adhärenierten im Bereich hoher Wandschubspannung keine oder nur vereinzelt Zellen. Die E-Selectin Abhängigkeit der Adhäsion wurde durch blockierende Anti-E-Selectin Antikörper verifiziert: im Bereich hoher Wandschubspannung konnte die Adhäsion durch den Antikörper vollständig blockiert werden (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12:** Adhäsion von HL60 Zellen an TNF $\alpha$  stimulierte kardiale Endothelzellen. Die Zellen wurden mit 1000 U/ml TNF $\alpha$  über 4 Stunden stimuliert und anschließend die Adhäsion von HL60 Zellen bestimmt. Gezählt wurde die Anzahl der fest adhärierenden Zellen pro Gesichtsfeld (Vergrößerung 1:100, n=4-12, \* =  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  TNF $\alpha$  gegen TNF $\alpha$  + BBA2, # =  $p < 0,05$ , ## =  $p < 0,01$  Kontrolle gegen TNF $\alpha$ )

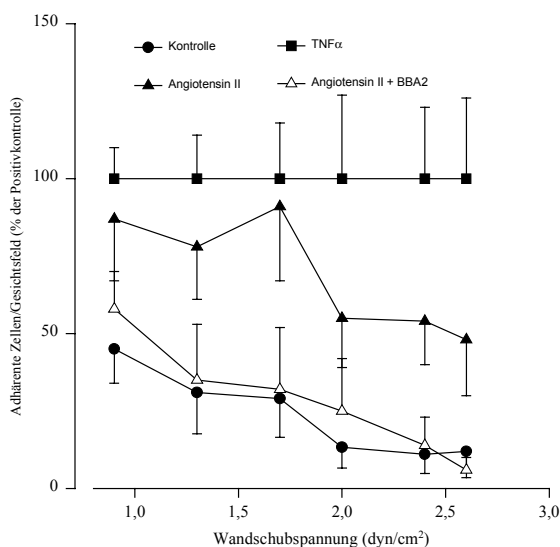
#### 4.2.2.2 Adhäsion von HL60 Zellen nach Stimulation mit Angiotensin II

Da Angiotensin II eine Steigerung der E-Selectin Expression auf koronaren Endothelzellen induzierte, ergab sich die Frage, ob diese Steigerung der E-Selectin Expression auch zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion führen könne. Dazu wurden koronare makrovaskuläre Endothelzellen mit Angiotensin II ( $10^{-7}$  M) über 4 Stunden stimuliert und anschließend die Adhäsion von HL60 Zellen unter Flußbedingungen quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde die HL60 Zelladhäsion nach Stimulation mit TNF $\alpha$  gemessen. Die Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II wurde in Prozent der Positivkontrolle (TNF $\alpha$  induzierte Adhäsion) berechnet.

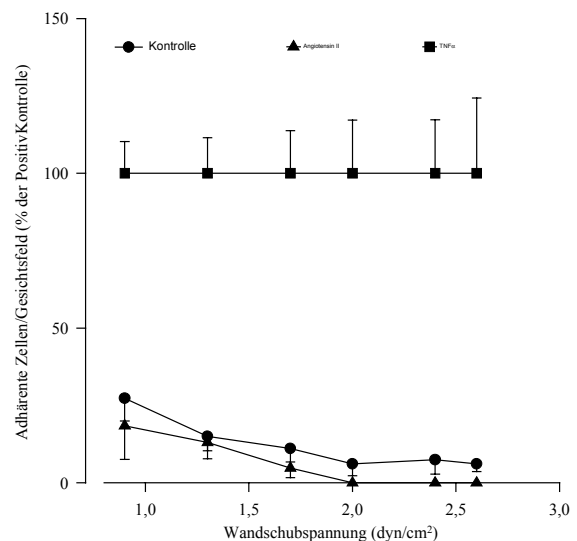


Angiotensin II induzierte eine deutliche Zunahme der Zelladhäsion, die gegenüber nicht stimulierten koronaren Endothelzellen in allen Wandschubspannungsbereichen signifikant erhöht war. Bei 2 dyne/cm<sup>2</sup> betrug die Angiotensin II induzierte Adhäsion 55 ± 16% der Positivkontrolle. Während die Zugabe eines Anti-E-Selectin Antikörpers die TNF $\alpha$  induzierte Adhäsion in diesem Wandschubspannungsbereich vollständig blockierte, konnte die Angiotensin II induzierte Adhäsion nicht vollständig gehemmt werden. Es muß daher vermutet werden, daß neben E-Selectin noch andere Adhäsionsmoleküle durch Angiotensin II induziert wurden. Es schienen dies jedoch weder VCAM-1 noch ICAM-1 zu sein, da diese in ihrer Expression von Angiotensin II nicht moduliert wurden (siehe Seite 65). An mikrovaskulären Endothelzellen induzierte Angiotensin II keine messbaren Veränderungen der HL-60 Adhäsion (Abbildung 4.13).

#### Makrovaskuläre koronare Endothelzellen

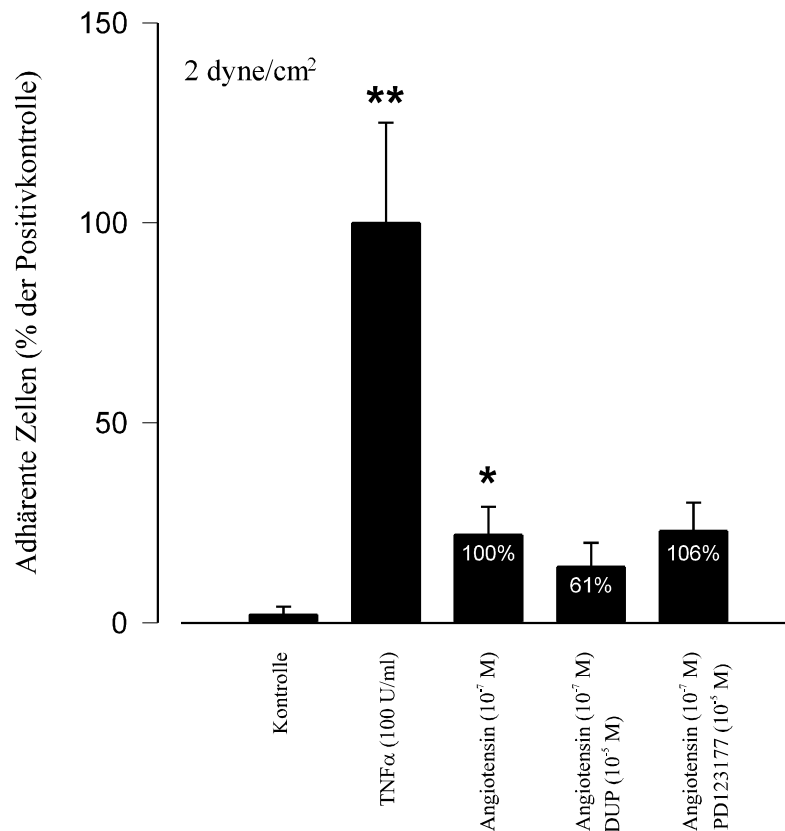


#### Mikrovaskuläre Endothelzellen



**Abbildung 4.13:** Adhäsion von HL60 Zellen an Angiotensin II stimulierte kardiale Endothelzellen. Die Zellen wurden mit 10<sup>-7</sup> M Angiotensin II über 4 Stunden stimuliert und anschließend die Adhäsion von HL60 Zellen bestimmt. Gezählt wurde die Anzahl der fest adhärierenden Zellen pro Gesichtsfeld (Vergrößerung 1:100). Die Zahl der adhärierenden Zellen wurde in Prozent der Positivkontrolle (TNF $\alpha$  stimulierte Zellen) dargestellt. n=4-12, \* = p < 0,05, \*\* p < 0,01 Angiotensin II gegen Kontrolle, # = p < 0,05, ## = p < 0,01 Angiotensin II gegen Angiotensin II + BBA2

Eine weitere Versuchsserie wurde durchgeführt, um zu differenzieren ob die Stimulation der E-Selectin abhängigen Adhäsion über Angiotensin II Typ1 oder Typ2 Rezeptoren vermittelt wurde. Koronare makrovaskuläre Endothelzellen wurden dazu mit Angiotensin II in Anwesenheit des Typ1 Rezeptorblockers DUP 753 ( $10^{-5}$  M) als auch des Typ2 Rezeptorblocker PD 123 177 ( $10^{-5}$  M) stimuliert. DUP 753 verminderte die Angiotensin II Wirkung um 66% ( $p < 0,05$ ), während PD123177 keine signifikante Hemmung verursachte. Gabe beider Rezeptorblocker zeigte einen vergleichbaren hemmenden Effekt, wie die Gabe von DUP 753 alleine. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Angiotensin II induzierte Expression von E-Selectin und die E-Selectin abhängige Adhäsion durch Angiotensin II Typ1 Rezeptoren vermittelt werden.



**Abbildung 4.14:** Wirkungen der Angiotensin II Rezeptorblocker DUP 753 (Typ1 Rezeptorblocker) und PD 123177 (Typ2 Rezeptorblocker) auf die Angiotensin II induzierte E-Selectin abhängige Adhäsion von HL60 Zellen. Makrovaskuläre koronare Endothelzellen wurden in Anwesenheit von DUP 753, PD123177 oder beiden Substanzen stimuliert und die Adhäsion von HL60 Zellen bestimmt. (n=5, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ )

#### **4.2.2.3 Adhäsion von HL60 Zellen nach Stimulation mit CD40 Ligand**

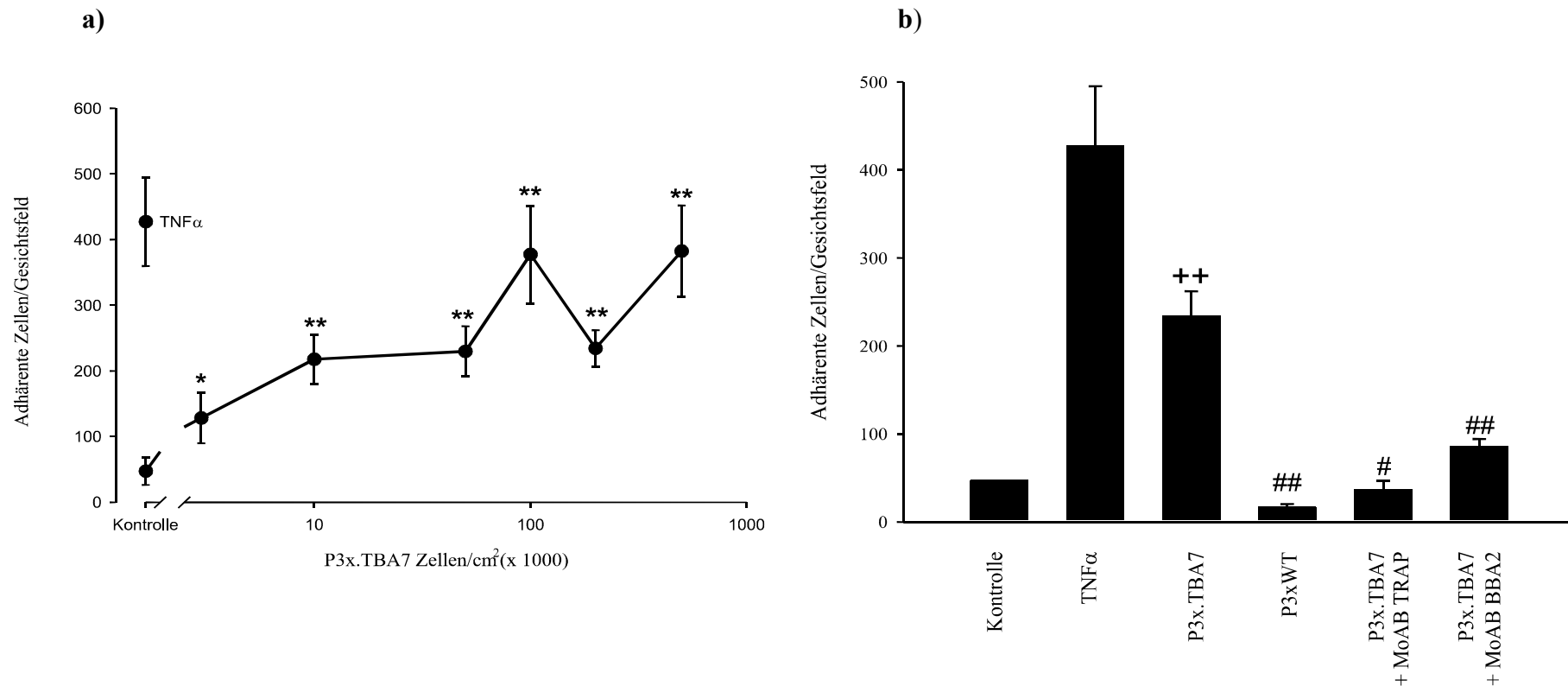
CD40 gehört in die Gruppe der TNF-Rezeptoren und induzierte - ähnlich wie TNF $\alpha$  - die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1. In welchem Maße auch die Adhäsion von HL60 Zellen beeinflusst wird, wurde mit Hilfe des Adhäsionsassays untersucht. Zur Stimulation wurde eine Myelomzelllinie, die stabil mit CD154 transfiziert worden war (Klon P3x.TBA7), verwendet. Um parakrine Effekte auszuschließen, wurden die CD154 positiven Zellen zuvor mit 2% Paraformaldehyd fixiert.

Ähnlich wie nach Stimulation mit TNF $\alpha$ , das als Positivkontrolle verwendet wurde, kam es in allen Wandschubspannungsbereichen zu einer Zunahme der HL60 Zelladhäsion.

Wandschubspannungsabhängig adhärten relativ mehr Zellen bei niedrigen Schergraden.

Allerdings waren die durch CD40 Stimulation induzierte Effekte deutlich geringer als die durch TNF $\alpha$  induzierten und betrugen im Wandschubspannungsbereich 2-2,6 dyn/cm<sup>2</sup> 36% und im Wandschubspannungsbereich 1-1,9 dyn/cm<sup>2</sup> 55% der TNF $\alpha$  induzierten Adhäsion.

CD154 negative Kontrollzellen (P3xWT) induzierten keine vermehrte Adhäsion im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Die stimulierende Wirkung konnte vollständig mit einem blockierenden CD154 Antikörper (MoAB TRAP, 10  $\mu$ g/ml) blockiert werden, während ein Kontrollantikörper gleichen Isotyps keine signifikante Hemmung vermittelte und so die Spezifität der Stimulation des CD40 Rezeptors belegten. Die E-Selectin Abhängigkeit wurde durch die Zugabe eines blockierenden E-Selectin Antikörpers bestätigt (MoAB BBA2, 10  $\mu$ g/ml).



**Abbildung 4.15:** E-Selectin abhängige Adhäsion von HL60 Zellen nach Stimulation von CD40. a) Nabelschnurvenen Endothelzellen wurden mit CD40 Ligand exprimierenden P3x.TBA7 Zellen für 4 Stunden stimuliert und anschließend die Adhäsion von HL60 Zellen im Wandschubspannungsbereich 1 - 1,9 dyn/cm<sup>2</sup> bestimmt. b) Vergleich der Adhäsion nach Stimulation mit TNFα (500 U/ml), CD40 Ligand (200 000 P3x.TBA7 Zellen/cm<sup>2</sup>), CD40 Ligand negativen Zellen (P3xWT) sowie in Anwesenheit eines Anti-CD40 Antikörpers (MoAB TRAP, 10µg/ml) und eines Anti-E-Selectin Antikörpers (MoAB BBA2, 10 µg/ml). n=5, \*=p<0,05, \*\*=p<0,01 Kontrolle gegen TNFα; #=p<0,05, ##=p<0,01 gegen CD40 Ligand alleine; ++=p<0,01 TNFα gegen CD40 Ligand

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß sowohl das Angiotensin II als auch CD40-CD40 Ligand Interaktionen entzündliche Reaktionen des Endothels aus der menschlichen koronaren Zirkulation spezifisch und charakteristisch modulieren.

Die Regulation der Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle durch verschiedene inflammatorische Zytokine ist von anderen Autoren ausführlich untersucht worden ([24](#), [27](#), [37](#), [139](#), [148](#)). Unbekannt war jedoch, daß auch Angiotensin II auf koronaren makrovaskulären Endothelzellen eine vermehrte E-Selectin Expression induziert. Diese Induktion der E-Selectin Expression war gefäßbettspezifisch, da nur eine geringe Expression auf Endothelzellen der Mikrozirkulation durch Angiotensin II induziert wurde ([86](#), [89](#)). Gefäßbettspezifische Unterschiede der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie sie hier gefunden wurden, sind bisher in einem humanen System nicht beschrieben worden. Ein Grund liegt sicher darin, daß es keine geeigneten Modelle für diese Untersuchungen gab. *In vivo* Untersuchungen am Menschen sind dann möglich, wenn die Meßgrößen registrierbar sind, wie es z.B. bei hämodynamischen Meßgrößen der Fall ist. In Bezug auf die Bestimmung der Expression von Adhäsionsmolekülen war man bisher auf histologische Untersuchungen an Operations- oder Sektionsmaterial angewiesen ([179](#)). Um wenigstens indirekt eine Aussage über die Stärke der Expression von Adhäsionsmolekülen zu erhalten, wurde bei verschiedenen Erkrankungen die Konzentration der Adhäsionsmoleküle im Blut gemessen ([2](#)). Die Wertigkeit dieser Messungen ist bislang unklar. Möglicherweise können jedoch in Zukunft durch neue Techniken der *in vivo* Markierung von spezifischen Molekülen solche Untersuchungen durchgeführt werden ([60](#), [264](#)).

Die an kultivierten humanen kardialen Endothelzellen untersuchten Mechanismen der Regulation von Adhäsionsmolekülen zeigte, daß die grundsätzlichen Regulationsmechanismen, die bei Endothelzellen aus Nabelschnurvenen beobachtet wurden, auch bei kardialen Endothelzellen auftraten ([90](#)): Die inflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor

(TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) induzierten eine vermehrte Expression der drei Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin ([25](#), [181](#), [191](#)), Interleukin-4 ausschließlich von VCAM-1 ([182](#)).

Die durch Angiotensin II induzierte Stimulation der E-Selectin Expression erreichte etwa die Hälfte der maximal durch TNF $\alpha$  induzierbaren Wirkungen. Maximale Effekte wurden bei Angiotensin II Konzentrationen von  $10^{-7}$  M beobachtet, bei denen auch andere Effekte des Angiotensin II *in vitro* beobachtet wurden ([9](#)).

Bemerkenswert war, daß bei Stimulation makrovaskulärer koronarer Endothelzellen mit TNF $\alpha$  niedrigere Konzentrationen als bei Stimulation mikrovaskulärer Endothelzellen notwendig waren, um vergleichbare Effekte zu induzieren. Es muß daher von einer besonders empfindlichen Regulation der E-Selectin Expression auf koronaren makrovaskulären Endothelzellen ausgegangen werden. Diese Empfindlichkeit der E-Selectin Regulation auf makrovaskulären koronaren Endothelzellen ist wohl auch der Grund dafür, daß dieser Effekt des Angiotensin II bisher nicht bekannt war, da als Modell meist Endothelzellen aus Nabelschnurvenen oder der Aorta verwendet wurden ([5](#), [138](#), [169](#)).

Neben den gefäßbettspezifischen Wirkungen des Angiotensin II zeigte sich auch hinsichtlich der Regulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle eine Spezifität, da selektiv die E-Selectin Expression moduliert wurde, während die Expression anderer ebenfalls untersuchter endothelialer Adhäsionsmoleküle wie z.B. VCAM-1 und ICAM-1 nicht änderte. Kürzlich konnte Pueyo et al ([195](#)) und Tummala et al ([241](#)) zeigen, daß auf Rattenendothelzellen durch Angiotensin II eine VCAM-1 Expression induziert werden kann. Da die Autoren nicht die Expression anderer Adhäsionsmoleküle untersucht haben, muß offenbleiben, ob Angiotensin II in diesem Modell auch die Expression von E-Selectin induzieren kann.

Die in den Versuchen mit koronaren makrovaskulären Endothelzellen durch Angiotensin II induzierte Expression von E-Selectin ist auch funktionell wirksam, da sie zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten *in vitro* führte. Entsprechend der nur geringen Stimulierbarkeit der E-Selectin Expression auf mikrovaskulären Endothelzellen konnte keine signifikante Steigerung der Leukozytenadhäsion an mikrovaskulären Endothelzellen beobachtet werden.

Die in Rattenendothelzellen beobachtete Induktion der VCAM-1 Expression durch

Angiotensin II ([195](#), [241](#)) ging mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B einher. NF- $\kappa$ B ist der wesentliche Transkriptionsfaktor der Regulation von E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 ([51](#), [52](#)). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß Angiotensin II auch die E-Selectin Expression über NF- $\kappa$ B induziert. Während bei glatten Muskelzellen die Signaltransduktion der Angiotensin Rezeptoren bereits ausführlich untersucht worden ist ([19](#), [262](#)), sind die Effekte des Angiotensin II auf Endothelzellen weit weniger gut untersucht. Möglicherweise bewirkt Angiotensin II, ähnlich wie bei glatten Muskelzellen, zunächst eine Induktion von IL-6, das dann NF- $\kappa$ B und nachfolgend E-Selectin aktiviert ([96](#)).

Aus Versuchen mit glatten Muskelzellen und Endothelzellen ist bekannt, daß Angiotensin II auch an der Regulation der NADPH Oxidase beteiligt ist ([93](#), [100](#)). Stimulation dieser Zellen mit Angiotensin II führte zu einer vermehrten intrazellulären Produktion von Sauerstoffradikalen.

Die Untersuchungen von Schreck et al ([210](#)) aber auch anderer Autoren ([259](#)) legen nahe, daß Sauerstoffradikale ein möglicher Aktivierungsmechanismus des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sein könnten. Es wäre daher vorstellbar, daß Angiotensin II auch über Stimulation der NADPH Oxidase und Erhöhung intrazellulärer Sauerstoffradikalkonzentrationen eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B und damit des E-Selectins induziert. Chen et al. konnten an glatten Muskelzellen nachweisen, daß die Angiotensin II abhängige Stimulation eines weiteren NF- $\kappa$ B abhängigen Gens, des Chemokins MCP-1, durch Katalase gehemmt wird ([45](#)). Diese Befunde sprechen für die Beteiligung von Sauerstoffradikalen an der Signaltransduktion des Angiotensin II.

Auf koronaren Endothelzellen konnten durch Bindungsstudien, RT-PCR und durch funktionelle Untersuchungen sowohl AT1 als auch AT2 Rezeptoren nachgewiesen werden ([145](#), [228](#)). Neben den klassischen Angiotensin-Rezeptoren wurden andere, atypische Angiotensin-Rezeptoren auf Endothelzellen vermutet ([127](#), [193](#)).

Um die Frage zu klären, welche Angiotensin-Rezeptoren an der Induktion der E-Selectin Expression auf koronaren Endothelzellen beteiligt sind, wurden spezifische Rezeptorantagonisten für AT1 und AT2 Rezeptoren verwendet. Die hier erhobenen Ergebnisse mit

humanen koronaren Endothelzellen zeigten funktionell lediglich Wirkungen von AT1 Rezeptoren. Ob dieses daran liegt, daß AT2 Rezeptoren keine Rolle bei der Regulation des E-Selectins spielen oder aber die hier verwendeten humanen koronaren Endothelzellen durch die Kulturbedingungen keine AT2 Rezeptoren exprimierten, kann nicht entschieden werden. Dazu wären z.B. in-situ Hybridisierungsmarkierungen notwendig, die bisher für Angiotensin Rezeptoren nicht gelungen sind. Es könnte so auch geklärt werden, welche Zellspezies AT2 Rezeptoren exprimiert, da in menschlichem Myokardgewebe der AT2 Rezeptor der dominierende Rezeptor zu sein scheint ([197](#)).

Die E-Selectin Induktion auf koronaren Endothelzellen durch AT1 Rezeptoren findet eine Entsprechung in Befunden, die für die Induktion der VCAM-1 Expression durch Angiotensin II erhoben wurden ([195](#)). Sie zeigten, daß die VCAM-1 Expression an Rattenendothelzellen ebenfalls durch AT1 Rezeptoren vermittelt wurde.

Neben den bisher unbekannten Wirkungen des Angiotensin II auf die E-Selectin Expression und E-Selectin abhängige Leukozytenadhäsion wurde ein weiterer Mechanismus der Regulation von Adhäsionsmolekülen, der in der Pathogenese arteriosklerotischer Plaques von Bedeutung sein könnte, untersucht: die Interaktion von endothelialen CD40 Rezeptoren und ihren auf aktivierten T-Lymphozyten exprimierten Liganden CD154.

CD40 ist ein Rezeptor der strukturelle Ähnlichkeiten mit den TNF-Rezeptoren besitzt und daher, sowie aufgrund der Signaltransduktion, über sogenannte TNF Rezeptor assoziierte Proteine (TRAFs) zur Familie der TNF-Rezeptoren gezählt wird ([17](#), [20](#)). Aus Versuchen mit CD40 Rezeptor stimulierenden Antikörpern ging hervor, daß CD40 ähnliche proinflammatorische Effekte auf Endothelzellen wie TNF $\alpha$  ausübt ([122](#)); die Effekte erschienen in den verwendeten Systemen aber gering zu sein.

Der Ligand des CD40, CD154, wird auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten exprimiert. CD154 kommt auch in einer löslichen Form vor ([12](#)), im Gegensatz zu TNF $\alpha$  ist die biologische Wirkung des sezernierten CD154 jedoch nicht gesichert. Daher muß davon ausgegangen werden, daß seine Wirkung an die Anwesenheit CD154 positiver Zellen gebunden ist.



Die Bedeutung des CD40 Systems wurde weiterhin durch die Beobachtung unterstrichen, daß aktivierte Thrombozyten ebenfalls CD154 exprimieren und damit Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und Sekretion von Chemokinen aktivieren können. Da die Bildung thrombozytenhaltiger Thromben eine häufige Komplikation arteriosklerotischer Plaques darstellt ([65](#)), ergibt sich eine neue Bewertung von Thromben für die Pathogenese der Arteriosklerose.

Zur Untersuchung der inflammatorischen Wirkungen durch Interaktionen von CD40 – CD154 wurde die Wirkung der CD40 Rezeptorstimulation auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und auf die Leukozytenadhäsion an kardialen mikrovaskulären Endothelzellen und Nabelschnurvenen Endothelzellen untersucht. In den hier durchgeführten Versuchen wurde zur Stimulation des CD40 Rezeptors auf Endothelzellen nicht ein stimulierender Antikörper oder der lösliche Ligand, sondern eine mit CD40 Ligand (CD154) transfizierte Myelomzelllinie verwendet ([84](#), [85](#)), die der *in vivo* Situation mit CD154 positiven aktivierten T-Lymphozyten ähnlich ist.

Es wurden durch CD40 Stimulation ähnliche Effekte wie durch Stimulation mit TNF $\alpha$  in Bezug auf Expression von Adhäsionsmolekülen und Adhäsion von Leukozyten beobachtet. Die CD40 Ligand induzierten Effekte erreichten ca. 50% der TNF $\alpha$  induzierten Effekte und waren also insgesamt schwächer als die durch TNF $\alpha$  induzierten. Trotz dieser etwas schwächeren Wirkungen induzierte die Stimulation des CD40 Rezeptors auf Endothelzellen ein inflammatorisches Signal, das für entzündliche Reaktionen von Bedeutung sein könnte ([26](#), [111](#)), jedoch aufgrund der Lokalisation des CD154 Rezeptors auf Lymphozyten lokal begrenzt auftritt, im Gegensatz zu den humoralen Wirkungen des TNF $\alpha$ .

Stimulation des CD40 Rezeptor aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ([106](#)). Ähnlich wie bei den TNF-Rezeptoren induziert die Bindung des Liganden an den Rezeptor eine Aktivierung verschiedener TRAFs, die dann zur Aktivierung des I- $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B Systems führen ([46](#)). Es ist daher auch verständlich, daß das Wirkungsspektrum des TNF $\alpha$  und des CD40 Rezeptors ähnlich ist und neben der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auch Gewebefaktor (tissue factor) einschließt ([217](#)).

Neben diesen *in vitro* Untersuchungen zeigen die Untersuchungen anderer Autoren die Be-

deutung der CD40- CD154 Interaktionen für die Pathogenese der Arteriosklerose. So konnte an einem Arteriosklerosemodell mit LDL Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt werden, daß die Unterbrechung der CD154 – CD40 Interaktion mit CD154 Antikörpern die Größe arteriosklerotischer Läsionen und ihren Lipidgehalt stark verminderte. Außerdem zeigten die mit Anti-CD154 behandelten Tiere weniger Makrophagen und T-Lymphozyten und eine niedrigere Expression von VCAM-1 im Bereich arteriosklerotischer Läsionen ([150](#), [151](#)).

Vielfältige Befunde haben die Bedeutung des RAS für die Pathogenese der Arteriosklerose aufgezeigt. Frühe Befunde zeigten eine Korrelation des Plasmapreninspiegels und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse ([32](#)). Neuere Befunde legen nahe, daß hypertensive Patienten mit dem Deletionspolymorphismus DD des ACE Gens, der mit höheren Plasma ACE-Spiegeln einhergeht, ein höheres Risiko an einem Myokardinfarkt zu erkranken, besitzen ([38](#), [188](#)). Behandlung von Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion und nach Myokardinfarkt zeigten eine bessere Prognose als Patienten, die nicht mit einem ACE-Hemmer behandelt wurden ([3](#), [183](#)). Auch tierexperimentelle Studien zeigten positive Wirkungen von ACE-Hemmern bei der Restenosebildung nach Ballonangioplastie ([192](#)) und in bestimmten Arteriosklerosemodellen ([47](#)). Alle diese Befunde konnten durch die hämodynamischen Effekte der ACE-Hemmer nicht erklärt werden. Unter Einbeziehung der hier gewonnen Ergebnisse muß die Ansicht, daß ACE-Hemmer nicht nur durch ihre hämodynamischen Effekte wirksam sind, bestärkt werden. Eine Verminderung der Angiotensin II Bildung würde neben blutdrucksenkenden Effekten und trophischen Wirkungen auf glatte Muskelzellen ([206](#)) auch die proinflammatorischen Effekte des Angiotensin II auf das vaskuläre Endothel vermindern und so zu einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, sowie zu einer verminderten Rekrutierung mononukleärer Zellen in arteriosklerotische Gefäßabschnitte führen. Damit wird erstmals eine Verbindung zwischen dem RAS und dem Entstehen und der Progression arteriosklerotischer Läsionen aufgezeigt.

Diese Befunde können die Grundlage für ein differenziertes therapeutisches Vorgehen bei kardiovaskulären Erkrankungen bilden. So kann eine ACE hemmende Medikation nicht nur als eine blutdrucksenkende Therapie verstanden werden, sondern darüber hinaus - aufgrund

der günstigen zellulären Wirkungen - auch als eine antiarteriosklerotische Therapie.

Auch eine antiaggregatorische Therapie bekommt durch die dargestellten Befunde eine Erweiterung als antiarteriosklerotische Therapie: wie oben dargestellt, können aktivierte T-Lymphozyten und Blutplättchen durch Stimulation des CD40 Rezeptors einen inflammatorischen Stimulus auf Endothelzellen ausüben. Eine antiaggregatorische Therapie würde durch Hemmung der Plättchenaktivierung lokale Entzündungsreaktionen vermindern und somit nicht nur die Bildung von Gefäßthromben reduzieren, sondern auch langfristig plättcheninduzierte proarteriosklerotische Wirkungen vermindern.

Dies sind zwei Beispiele dafür, daß durch die Etablierung des hier geschilderten Untersuchungsmodells mit kultivierten kardialen Endothelzellen neue Denkmodelle der pathophysiologischen Zusammenhänge entstehen können und die Differentialtherapie kardiovaskulärer Erkrankungen neue Beurteilungskriterien bekommt.

## 5 Charakterisierung der L-Selectin abhängigen Adhäsion an kardialen mikrovaskulären Endothelzellen

### 5.1 Einleitung

Leukozytenadhäsion und Emigration in das umliegende Gewebe wird bei allen Entzündungsreaktionen beobachtet, zum Beispiel im Rahmen akuter bakterieller oder viraler Entzündungen ([190](#), [221](#)), bei der Arteriosklerose ([200](#)) und bei Transplantatabstoßungsreaktionen ([31](#)). L-Selectin ist ein Adhäsionsmolekül, das auf Leukozyten exprimiert wird und sowohl bei der Lymphozyten-Rezirkulation als auch bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen für die Adhäsion von Leukozyten von Bedeutung ist ([163](#), [207](#), [234](#), [242](#)). L-Selectin wird von fast allen Leukozyten und ihren Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert ([36](#), [233](#)).

Auf hochendothelialen Venolen des Lymphgewebes wurden mehrere L-Selectin Liganden identifiziert, u.a. GlyCAM-1 ([257](#)), CD34 ([16](#)), MadCAM-1 ([229](#)) und ein Podocalyxin ähnliches Protein ([208](#)). Diese Liganden sind stark glykosilierte Proteine, die Ähnlichkeit mit Mucinen haben und die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als L-Selectin Liganden fungieren ([158](#)). Gemeinsam ist diesen Liganden, daß sie alle das MECA79 Epitop exprimieren und ihre Aktivität als Ligand durch Behandlung mit Neuraminidase verloren geht. Weiterhin sind posttranslationale Sulfatierungsreaktionen für ihre Aktivität notwendig, da eine Hemmung dieser Sulfatierungsreaktionen durch Perchlorat mit einem Aktivitätsverlust als L-Selectin Liganden einhergeht ([112](#)).

Neben der L-Selectin Abhängigkeit der Lymphozytenrezirkulation im Lymphgewebe ist L-Selectin-abhängiges Rollen und Adhäsion von Leukozyten auch an vaskulären Endothelzellen mehrfach beschrieben worden ([143](#), [144](#), [149](#), [240](#), [250](#)). Während die Bedeutung des L-Selectins für die Leukozytenrekrutierung in Tiermodellen gut etabliert ist, ist die Bedeutung

der L-Selectin abhängigen Adhäsion im menschlichen Körper und bei der Pathogenese der Arteriosklerose bisher nicht bekannt. Erschwerend für die Beurteilung kommt hinzu, daß ein GlyCAM-1 homologes Molekül im humanen System bisher nicht identifiziert werden konnte. Im Gegensatz zu den Liganden in HEV ist es bisher nicht gelungen, endotheliale Liganden außerhalb der HEV zu isolieren und zu klonieren. Es gibt jedoch Hinweise, daß Proteoglykane ([79](#), [176](#)) und/ oder Glykolipide ([6](#)) bei der L-Selectin abhängigen Adhäsion an vaskulärem Endothel eine Rolle spielen.

In ersten Untersuchungen konnte von uns L-Selectin abhängige Adhäsion an kardialen mikrovaskulären Endothelzellen beobachtet werden ([269](#)). Die Adhäsion von L-Selectin positiven NALM6-L Zellen war bei nicht stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen nicht nachweisbar und trat erst nach Stimulation der Endothelzellen mit dem proinflammatorischen Zytokin  $\text{TNF}\alpha$  auf. Ähnlich wie bei den bekannten Liganden auf HEV konnte durch Hemmung von Sulfatierungsreaktionen die Adhäsion gehemmt werden. Im Gegensatz zu Liganden auf HEV war die Aktivität des Liganden jedoch mit Neuraminidase nicht zu beeinflussen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen sollten den putativen Liganden auf mikrovaskulären kardialen Endothelzellen weiter charakterisieren und insbesondere die Frage beantworten, in welche Substanzgruppe der Ligand eingeordnet werden kann und die Glykanstrukturen, die für die Funktion des Liganden notwendig sind, charakterisieren.

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 *Adhäsion von NALM6-L Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$*

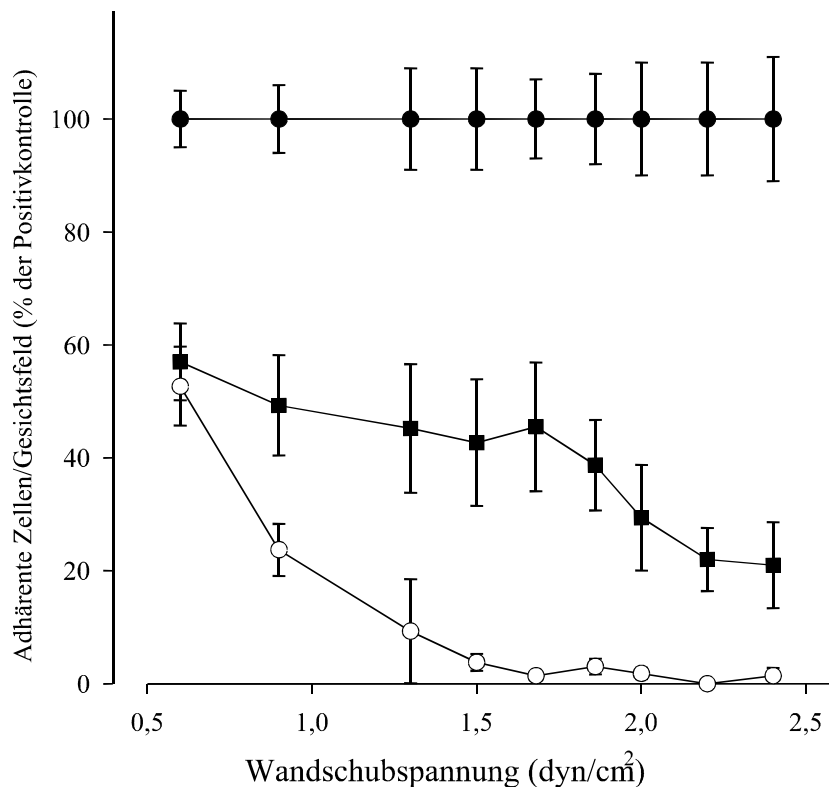
L-Selectin transfizierte NALM6-L Zellen adhärten nach Stimulation mikrovaskulärer Endothelzellen mit TNF $\alpha$  an diesen Zellen besser als an nicht stimulierten. Ähnlich wie bei Verwendung von HL60 Zellen (siehe Seite 70) adhärten in den Bereichen hoher Wandschubspannung an unstimulierten mikrovaskulären Endothelzellen keine oder nur vereinzelt NALM6-L Zellen (bei 2.0 dyn/cm<sup>2</sup>,  $0.2 \pm 0.09$  (Mittelwert  $\pm$  SEM) NALM6-L Zellen/Gesichtsfeld), in den Bereichen niedriger Wandschubspannung adhärten regelmäßig einige Zellen ( $38 \pm 7$  Zellen/Gesichtsfeld). Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  über 5 Stunden kam es zu einer starken Zunahme der Adhäsion: bei einer Wandschubspannung von 2.0 dyn/cm<sup>2</sup> adhärten  $9 \pm 1$ , bei 0.9 dyn/cm<sup>2</sup>  $167 \pm 10$  Zellen/Gesichtsfeld ( $p < 0.01$  gegen unstimulierte Kontrollen, Abbildung 5.1).

Um den L-Selectin abhängigen Anteil der Adhäsion zu überprüfen, erfolgte ein Vergleich mit L-Selectin negativen NALM6 Zellen. Dabei zeigte sich, daß in Bereichen hoher Wandschubspannung NALM6-L deutlich besser als NALM6 Zellen adhärten. Bei 2 dyn/cm<sup>2</sup> betrug die Zahl der adhärten NALM6 nur  $2,5 \pm 0.8$  Zellen, dies entspricht 29% der Adhäsion von NALM6-L Zellen und stieg bei 0,9 dyn/cm<sup>2</sup> auf 49+7% der Positivkontrolle. Dies zeigt, daß in den Bereichen hoher Wandschubspannung der Anteil der L-Selectin abhängigen Adhäsion am größten ist und bei niedriger Wandschubspannung an Bedeutung verliert (Abbildung 5.1).

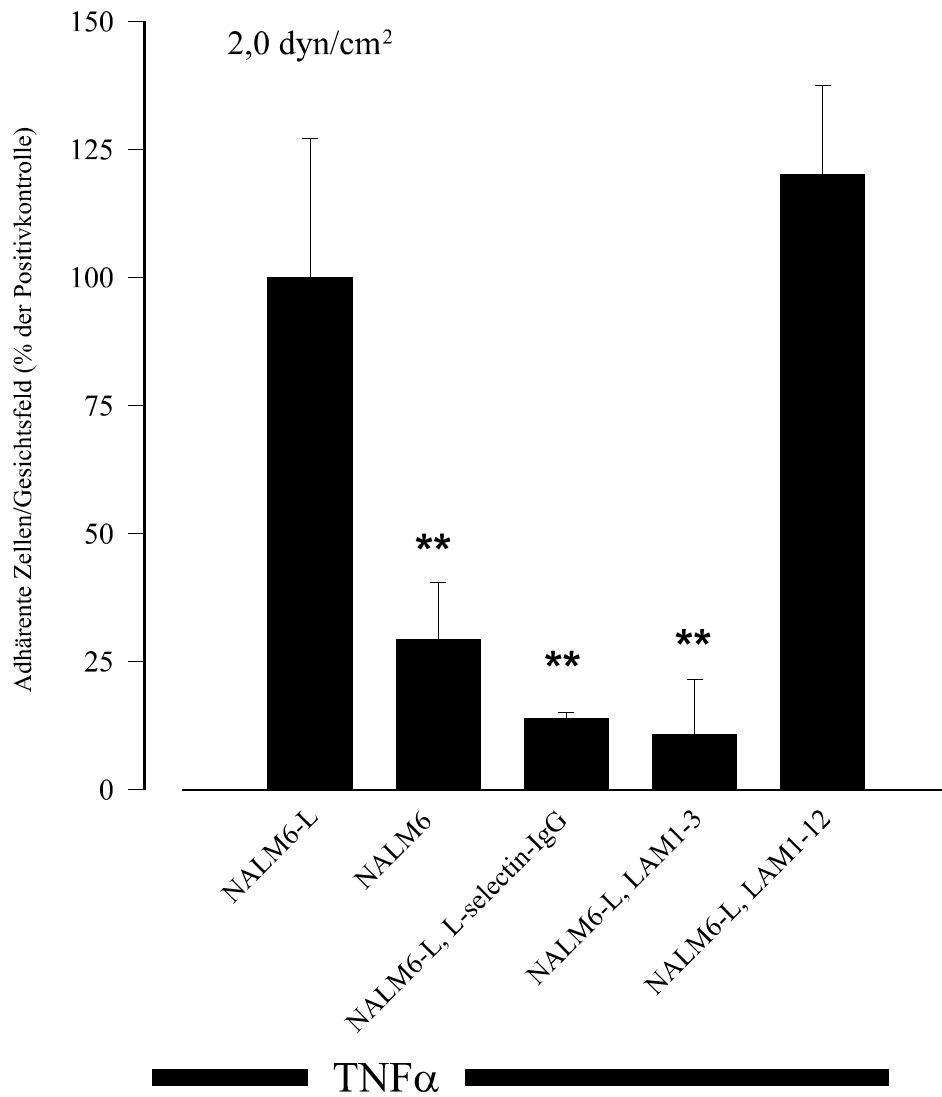
Um die L-Selectin Abhängigkeit der Adhäsion weiter zu verifizieren, wurden Inhibitionsexperimente mit einem adhäsionshemmenden Anti-L-Selectin Antikörper, LAM 1-3, und einer L-Selectin IgG Chimäre durchgeführt. Nach Zugabe der Chimäre und des Anti-L-Selectin Antikörpers wurde die Adhäsion der NALM6-L Zellen an TNF $\alpha$  stimuliertem Endothel fast auf Kontrollwerte reduziert. Damit konnte bestätigt werden, daß nach

Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  L-Selectin abhängige Adhäsion an mikrovaskulären Endothelzellen induziert werden kann (Abbildung 5.2).

Interessanterweise konnte eine ähnlich starke L-Selectin abhängige Adhäsion an makrovaskulären koronaren Endothelzellen nicht beobachtet werden. Nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  unterschied sich die Adhäsion L-Selectin positiver NALM6-L und negativer NALM6 Zellen nicht signifikant voneinander. Es kann daraus geschlossen werden, daß L-Selectin abhängige Adhäsion vor allem in Gefäßen der Mikrozirkulation eine Rolle spielt.



**Abbildung 5.1:** L-Selectin abhängige Adhäsion an mikrovaskulären Endothelzellen. Die Adhäsion von L-Selectin positiven NALM Zellen (NALM6-L, gefüllte Kreise) nach Stimulation der mikrovaskulären Endothelzellen mit  $\text{TNF}\alpha$  über 5 Stunden wurde als Positivkontrolle verwendet und mit der Adhäsion L-Selectin negativer NALM Zellen an  $\text{TNF}\alpha$  stimulierte Endothelzellen (NALM6, geschlossene Vierecke) und NALM6-L an nicht stimulierte Endothelzellen (offene Kreise) verglichen (n= 12)



**Abbildung 5.2:** Effekte des Anti-L-Selectin Antikörpers LAM 1-3 und der L-Selectin IgG Chimäre auf die Adhäsion von NALM6-L Zellen an TNF $\alpha$  stimulierte mikrovaskuläre kardiale Endothelzellen (n = 3, \* = p<0.05).



### **5.2.2 Adhäsion von NALM6-L Zellen nach Stimulation mit CD40 Ligand**

Da Stimulation von Endothelzellen durch den CD40 Rezeptor in Bezug auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und E-Selectin abhängige Adhäsion von HL60 Zellen ähnliche Wirkungen induzierte wie Stimulation des TNF $\alpha$  Rezeptors, sollte untersucht werden, ob auch die L-Selectin abhängige Adhäsion der NALM6-L Zellen durch CD40 Stimulation induziert werden kann. Dazu wurden mikrovaskuläre Endothelzellen mit CD154 positiven, P3x.TBA7 Zellen inkubiert und anschließend die Adhäsion der NALM6-L Zellen unter Flußbedingungen geprüft. Stimulation mit TNF $\alpha$  diente wiederum als Positivkontrolle und die Adhäsion der L-Selectin negativen NALM6 Zellen der Kontrolle der L-Selectin Abhängigkeit.

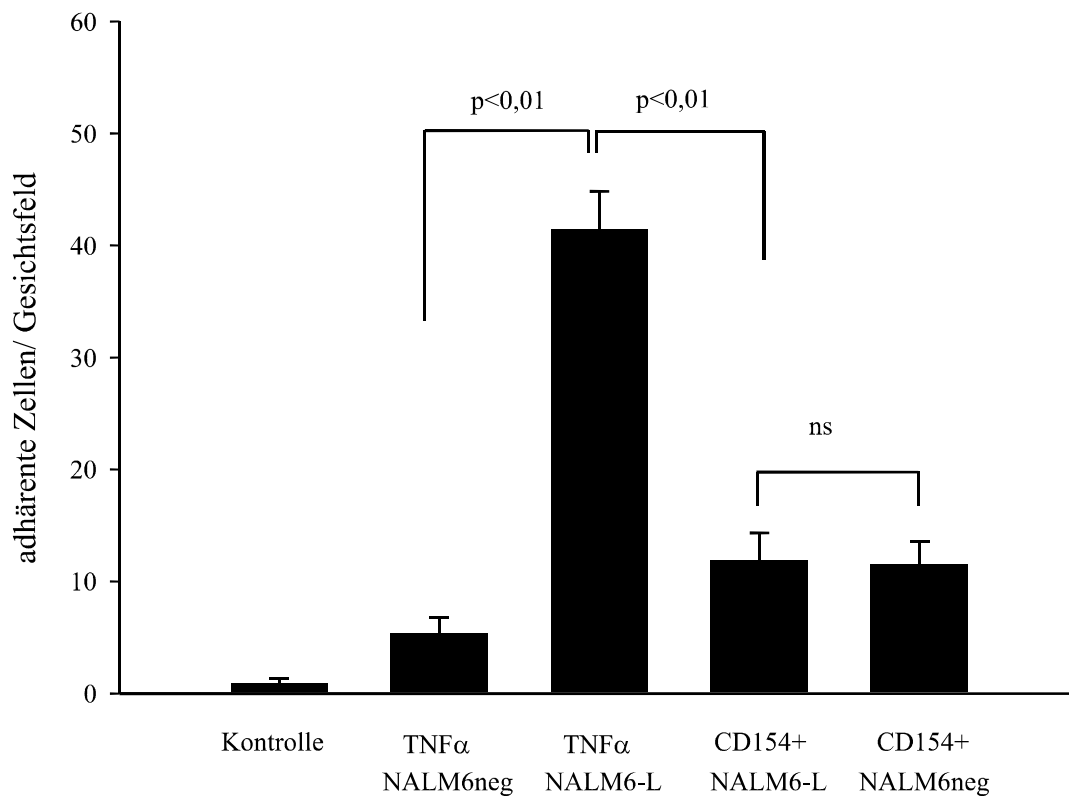
Es zeigte sich, daß nach CD40 Stimulation NALM6 und NALM6-L Zellen besser als an unstimulierten MEC adhärten, daß jedoch kein Unterschied zwischen L-Selectin positiven und negativen NALM6 Zellen bestand. Es muss daraus geschlossen werden, daß anders als TNF $\alpha$ , CD154 keine Liganden, die L-Selectin abhängige Adhäsion vermitteln können, induziert (Abbildung 5.3).

### **5.2.3 Untersuchungen zur Wirkung von Neuraminidase**

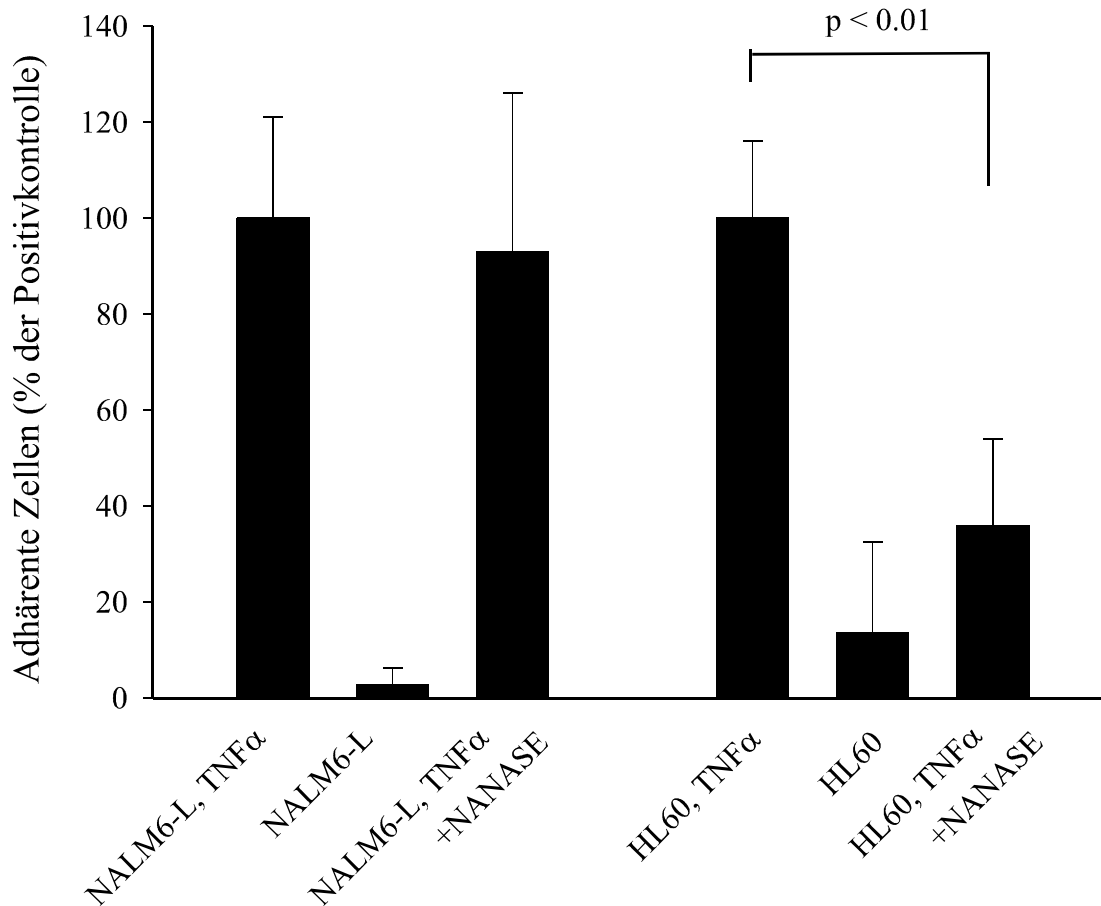
Ein wesentliches Charakteristikum der L-Selectin Liganden (CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1) auf hochendothelialen Venolen sind sialinsäurehaltige Zuckergruppen. Abspaltung der sialinsäurehaltigen Zuckergruppen führte zu einem Funktionsverlust der Liganden, die daraufhin nicht mehr L-selectin binden konnten. Es sollte daher untersucht werden, ob L-Selectin abhängige Adhäsion an mikrovaskulären Endothelzellen ebenfalls von der Anwesenheit sialinsäurehaltiger Zuckergruppen abhängig ist. Sialinsäurehaltige Zuckergruppen können durch Behandlung mit dem Enzym Neuraminidase abgespalten werden. Als Positivkontrolle dienten HL60 Zellen, die ebenfalls sialinsäurehaltige Liganden für P- und E-Selectin

exprimieren ([142](#), [146](#)).

Behandlung von HL60 Zellen mit Neuraminidase reduzierte die Adhäsion an TNF $\alpha$  stimulierte MEC auf 32% (Abbildung 5.4). Bei einer Wandschubspannung  $> 2 \text{ dyn/cm}^2$  adhärten  $41 \pm 6$  HL-60 Zellen an dem mit TNF $\alpha$  stimulierten Endothel gegenüber  $13 \pm 3$  ( $p=0,0019$ ) neuraminidasebehandelten HL-60 Zellen. Die Adhäsion von HL-60 Zellen an unstimulierte Endothelzellen betrug  $6 \pm 8$  Zellen.



**Abbildung 5.3:** L-Selectin abhängige Adhäsion von NALM6-L Zellen bei  $2 \text{ dyn/cm}^2$  nach Stimulation des CD40 Rezeptors. Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden mit CD154 positiven P3x.TBA7 Zellen für 5 Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle wurden Endothelzellen mit 500 U/ml TNF $\alpha$  stimuliert. L-Selectin negative NALM6 Zellen dienten als Negativkontrolle ( $n = 5$ )



**Abbildung 5.4:** Wirkung von Neuraminidase auf L-Selectin abhängige Adhäsion von NALM6-L Zellen und E-Selectin abhängiger Adhäsion von HL60 Zellen an mikrovaskuläre kardiale Endothelzellen (n = 3)

Im Gegensatz dazu beeinflusste Neuraminidasebehandlung von mikrovaskulären Endothelzellen die L-Selectin abhängige Adhäsion nicht: NALM6-L Zellen adhärten an behandelten und unbehandelten mikrovaskulären Endothelzellen vergleichbar gut. Die Adhäsion von NALM6-L Zellen betrug  $0,7 \pm 0,8$  Zellen an unstimulierten, gegenüber  $24 \pm 5$  Zellen an mit TNF $\alpha$  stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen bei Wandschubspannungen  $> 2,0$  dyn/cm<sup>2</sup>. Bei Zugabe von Neuraminidase adhärten  $22 \pm 8$  Zellen an TNF $\alpha$  stimulierte mikrovaskuläre Endothelzellen (Abbildung 5.4).

#### ***5.2.4 Untersuchungen zur Wirkung von O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase und Tunicamycin***

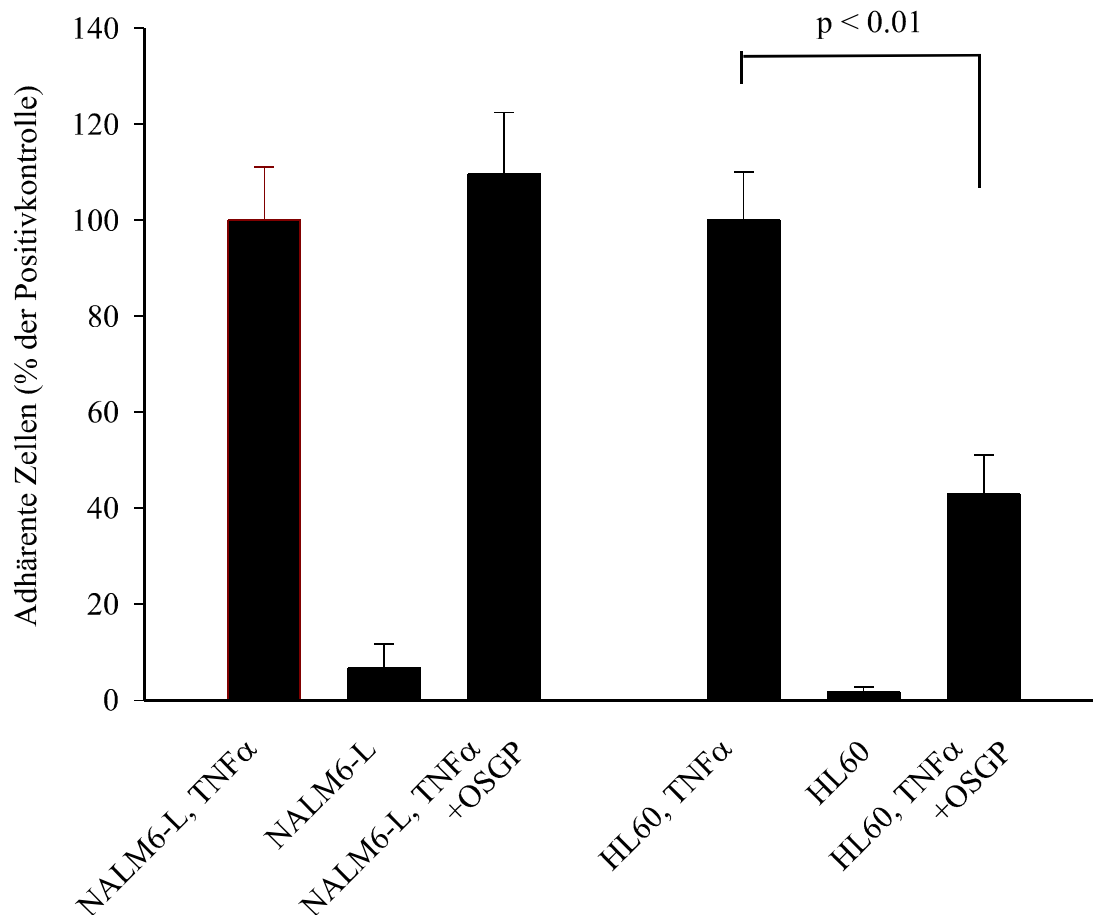
Zuckergruppen von Glykoproteinen können prinzipiell über eine O- oder N-glykosidische Bindung an den Proteinanteil gebunden sein. Da auch der auf mikrovaskulären Endothelzellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$  exprimierte L-Selectin Ligand vermutlich ein Glykoprotein ist, das mit seinen Zuckergruppen mit der Lectindomäne des L-Selectins interagiert, wurde in den folgenden Versuchen die Beteiligung von O- und N-glykosidisch gebundenen Zuckergruppen an der L-Selectin abhängigen Adhäsion untersucht. Tunicamycin hemmt die Bildung N-glykosidischer Zuckerseitenketten ([53](#)). Es wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  30 Minuten vor Stimulation mit TNF  $\alpha$  zu den mikrovaskulären Endothelzellen gegeben.

O-Siaologlykoprotein-Endopeptidase (OSGP) ist eine Metalloproteinase (EC 3.4.24.57), die Proteine mit O-glykosidisch gebundenen sialinsäurehaltigen Oligosacchariden ([1](#)), meist mucinartige Moleküle wie PSGL-1, der Ligand des P-Selectins ([177](#), [225](#)), spaltet. Es wurden bei dieser Versuchsserie wiederum Untersuchungen mit HL60 Zellen durchgeführt, da bereits gezeigt wurde, daß OSGP Liganden für P-Selectin inaktiviert ([225](#)) und Versuche mit HL60 Zellen als Positivkontrolle für die Wirksamkeit des Enzyms gelten konnten. O-Sialoglykoprotein Endopeptidase wurde in einer Konzentration 80  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

Die Adhäsion von HL-60 Zellen an unstimulierten mikrovaskulären Endothelzellen betrug  $0,7 \pm 0,4$  Zellen/ Gesichtsfeld bei Wandschubspannungen  $> 2,0 \text{ dyne/cm}^2$ . Nach Stimulation des Endothels mit TNF $\alpha$  für 5 Stunden kam es zu einem signifikanten Anstieg der Adhäsion der HL-60 Zellen auf  $40 \pm 4$  Zellen/ Gesichtsfeld. Die Vorbehandlung der HL-60 Zellen mit O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase führte zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsion auf  $21 \pm 4$  ( $p=0,0029$ ,  $n=5$ , Abbildung 5.5).

Versuche mit NALM6-L Zellen zeigten eine geringe Adhäsion an unstimulierten mikrovaskulären Endothelzellen bei Wandschubspannungen  $> 2,0 \text{ dyn/cm}^2$ , im Mittel adhärten  $1 \pm 0,7$  Nalm6-L Zellen. Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  stieg die Zahl der

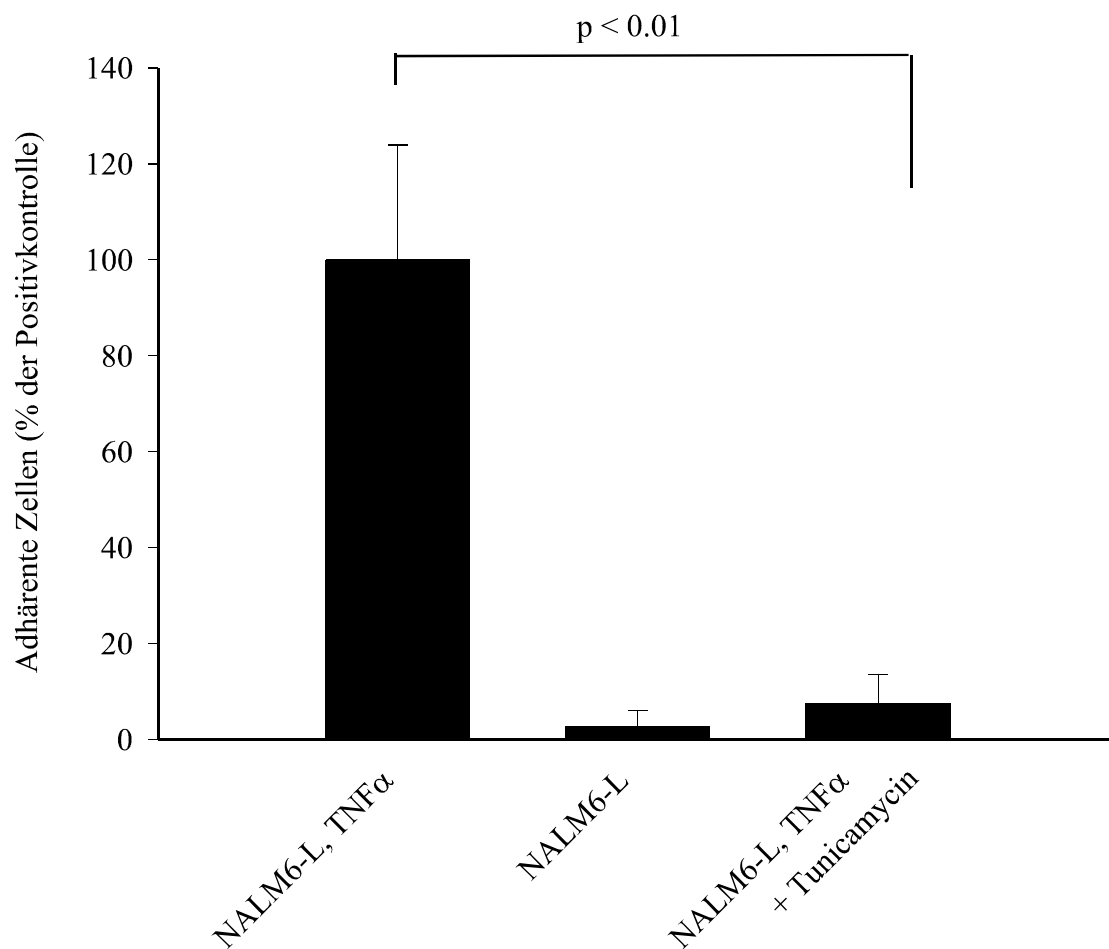
adhärierten Zellen auf  $15 \pm 2$  Zellen an. Die Inkubation mikrovaskulärer Endothelzellen mit OSGP nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  hatte keinen Einfluß auf die Adhäsion der Nalm6-L Zellen, sie lag im Mittel bei  $16 \pm 2$  Zellen ( $n=7$ , Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5:** L-Selectin abhängige Adhäsion nach Inkubation der mikrovaskulären Endothelzellen mit O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase (OSGP, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , links). Die Wirksamkeit der Behandlung mit OSGP wurde mit HL 60 Zellen verifiziert (rechts)

Im Gegensatz zu OSGP zeigte Behandlung mikrovaskulärer Endothelzellen mit Tunicamycin eine deutliche Wirkung: es reduzierte die L-Selectinabhängige Adhäsion auf Kontrollwerte. In

dieser Versuchsreihe adhärten keine NALM6-L Zellen an unstimulierten mikrovaskulären Endothelzellen, Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  erhöhte die L-Selectin abhängige Adhäsion auf  $21 \pm 5$  NALM6-L Zellen bei Wandschubspannungen  $> 2 \text{ dyn/cm}^2$ . Wurden die Endothelzellen vor Stimulation für 30 Minuten mit  $10 \mu\text{g/ml}$  Tunicamycin inkubiert, kam es zur signifikanten Reduktion der  $\text{TNF}\alpha$  induzierten NALM6-L Adhäsion auf  $2 \pm 1$  Zellen ( $p < 0.01$ ,  $n = 5$ , Abbildung 5.6).

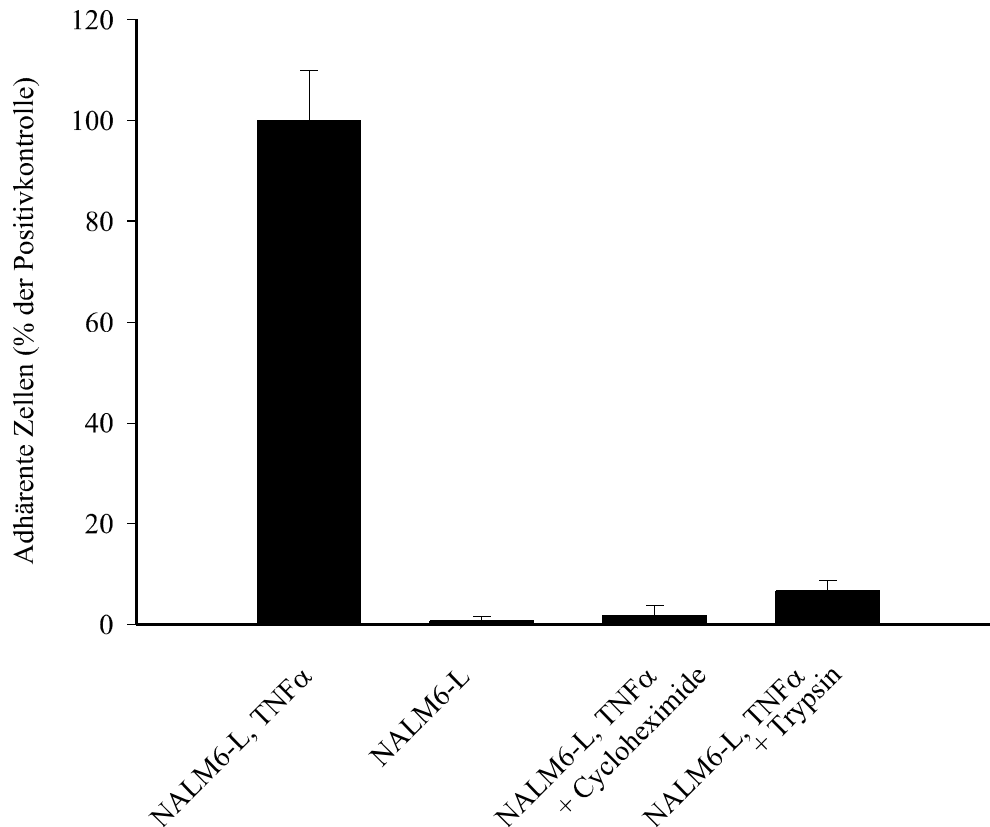


**Abbildung 5.6:** Hemmung der L-Selectin abhängigen Adhäsion von NALM6-L Zellen an  $\text{TNF}\alpha$  stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen durch Tunicamycin ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), einem Hemmer der N-Glykosilierung ( $n = 5$ )

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß für die Aktivität des auf mikrovaskulären Endothelzellen exprimierten Liganden N-glykosidisch gebundenen Zuckergruppen bedeutsam sind, während O-glykosidisch gebundene Gruppen keine Bedeutung für die L-Selectin Bindung an den Liganden haben.

#### ***5.2.5 Untersuchungen zur Wirkung von Cycloheximid und Trypsin***

Da berichtet worden war, daß auch Glykolipide als Liganden für L-Selectin fungieren können (6, 159), sollte überprüft werden, ob der auf mikrovaskulären Endothelzellen exprimierte Ligand Proteinanteile enthält. Dieses wurde durch Zugabe eines proteolytischen Enzyms, Trypsin, getestet. In Vorversuchen war die Konzentration ermittelt worden, mit der mikrovaskuläre Endothelzellen ausgesetzt werden können, ohne daß es zu einer sichtbaren strukturellen Veränderung oder Ablösung der Zellen von der Matrix kommt. Bei den Versuchen wurde eine Konzentration von 0,1 mg/ml Trypsin (1:250) eingesetzt.



**Abbildung 5.7:** Wirkung von Trypsin und Cycloheximid auf die TNF $\alpha$  induzierte L-Selectin abhängige Adhäsion von NALM6-L Zellen bei Wandschubspannungen  $> 2 \text{ dyn/cm}^2$

Nachdem die Versuche mit Trypsineinwirkung gezeigt hatten, daß der auf mikrovaskulären Endothelzellen exprimierte L-Selectin Ligand Proteinanteile enthält, sollte nun untersucht werden, ob zur Induktion der L-Selectin abhängigen Adhäsion eine Proteinneubildung notwendig ist. Die Proteinbildung wurde durch den Translationsblocker Cycloheximid (1  $\mu\text{g/ml}$ ) gehemmt. An unstimulierten mikrovaskulären Endothelzellen adhärten bei diesen Versuchen im Mittel  $0,3 \pm 0,3$  NALM6-L Zellen/ Gesichtsfeld, an TNF $\alpha$  stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen  $19 \pm 3$  Zellen/ Gesichtsfeld bei Wandschubspannungen  $> 2,0 \text{ dyn/cm}^2$ . Cycloheximid (1  $\mu\text{g/ml}$ ) reduzierte die Adhäsion bei TNF $\alpha$  stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen wiederum auf Kontrollwerte von  $0,8 \pm 0,6$  Zellen/ Gesichtsfeld ( $p = 1,8 \times 10^{-5}$ ,  $n = 5$ , Abbildung 5.7).



Die erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, daß Proteine während der Stimulation mit TNF $\alpha$  neu gebildet werden, die an der Adhäsion der NALM6-L Zellen beteiligt sind. Es ist dabei denkbar, daß entweder die Bildung des Liganden selber oder andererseits Enzyme, die den Liganden modifizieren, z.B. glykosilieren, neu gebildet werden.

### **5.2.6 Untersuchungen zur Wirkung von Heparinasen**

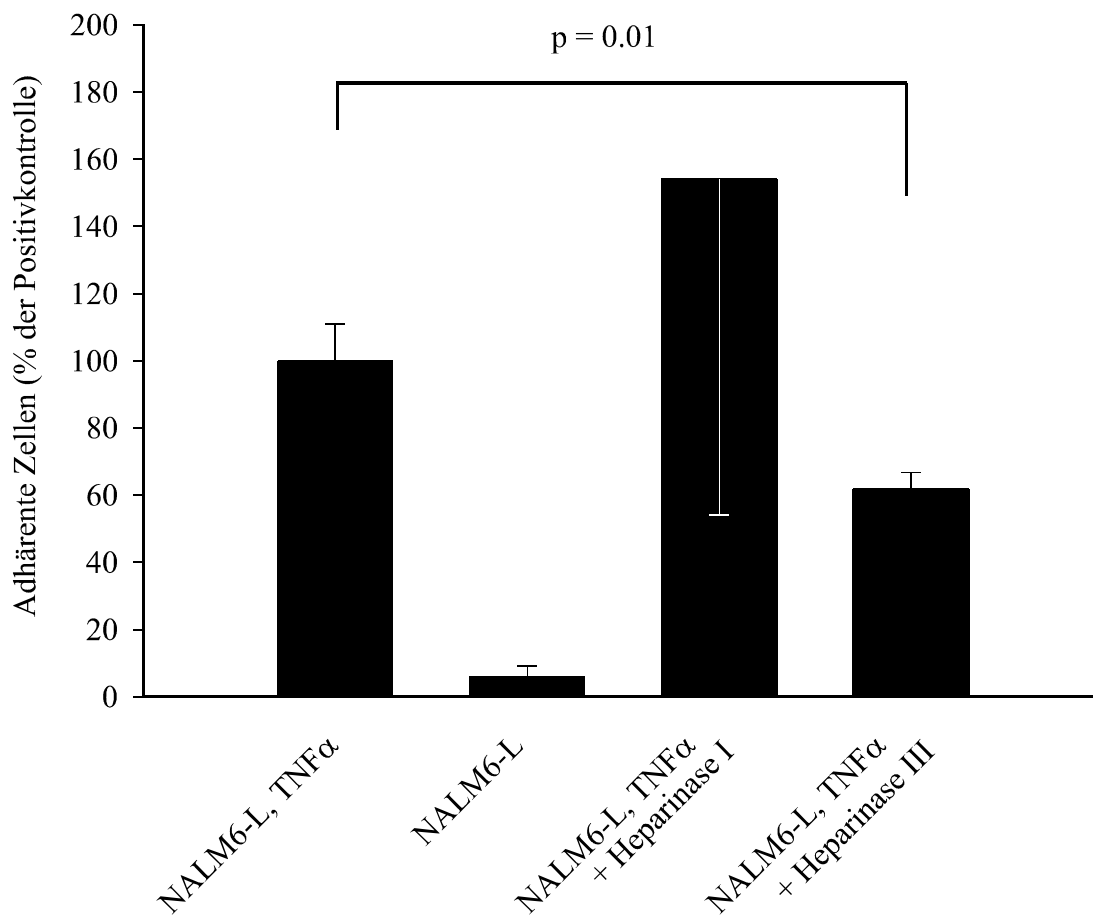
Varki et al ([129](#), [176](#)) und Spertini et al ([79](#)) hatten dargestellt, daß Proteoglykane als Liganden an bovinen Endothelzellen mit L-Selectin interagieren können. Auch bei mikrovaskulären Endothelzellen kommen Proteoglykane als Liganden für L-Selectin in Frage. Um dies zu untersuchen, bieten sich Heparinasen an, die unterschiedliche Spezifitäten besitzen. Heparinase I spaltet Heparin, während Heparinase III (Heparitinase I) Heparansulfat, das u.a. auch von Endothelzellen gebildet wird ([176](#)), spaltet.

Heparinase I wurde in mehreren Konzentrationen des Enzyms bis max 0,2 IU/ml untersucht. Dabei führte eine Behandlung des stimulierten Endothels mit Heparinase I in keiner der untersuchten Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion der NALM6-L Zellen.  $1 \pm 0,8$  NALM6-L Zellen/ Gesichtsfeld adhärten bei einer Wandschubspannung von  $> 2,0 \text{ dyn/cm}^2$  an unstimulierten mikrovaskulären Endothelzellen. Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  stieg die Adhäsion auf  $19 \pm 3$  Zellen (=100%). Die Inkubation der mit TNF $\alpha$  stimulierten Endothelzellen mit 0,2 IU/ml Heparinase I zeigte keinen Einfluß auf die Adhäsion der NALM6-L Zellen. Die Adhäsion war mit  $29 \pm 18$  Zellen (n=3) sogar etwas höher gegenüber den alleine mit TNF $\alpha$  stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen.

Heparinase III Behandlung (0,2 IU/ml) reduzierte - im Gegensatz zu Heparinase I - die TNF $\alpha$  induzierte Adhäsion signifikant auf  $12 \pm 1$  Zellen (63% der Positivkontrolle, p=0,0162, n=3, Abbildung 5.8).

Die Aktivität des Enzyms Heparinase I wurde in einem Assay entsprechend den Angaben des Herstellers zur Überprüfung der Aktivität des Enzyms bestätigt. Dabei wurde die Spaltung

von Heparin photometrisch bei 234 nm gemessen.



**Abbildung 5.8:** Die Wirkung von Heparinase I und Heparinase III (Heparitinase I) auf die L-Selectin abhängige Adhäsion von NALM-6 Zellen an TNFα stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen (n = 3). \* =  $p < 0,05$  gegen TNFα

### 5.3 Diskussion

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß L-Selectin abhängige Adhäsion *in vitro* an kardialen mikrovaskulären Endothelzellen nachweisbar war. In einem Wandschubspannungsbereich von ca. 1 – 2,6 dyn/cm<sup>2</sup> adhärten stabil mit L-Selectin transfizierte NALM6 Zellen (NALM6-L) stärker als nicht-transfizierte Wildtypzellen nach fünfstündiger Stimulation der mikrovaskulären Endothelzellen mit TNF $\alpha$ . An ruhenden, nicht stimulierten Endothelzellen ließ sich dagegen keine L-Selectin abhängige Adhäsion nachweisen. Die weiteren Versuche zur Charakterisierung der L-Selectin Bindung ließen vermuten, daß die Adhäsion vermittelnden Liganden Proteinanteile besitzen, da sie durch milde Trypsinbehandlung ihre Bindungsfähigkeit verloren. Des weiteren konnte durch Inkubation mit Enzymen, die spezifische Glykanstrukturen abbauen, bzw. die Bildung dieser Strukturen hemmen, gezeigt werden, daß vor allem N-glykosidisch gebunden Zuckerseitenketten für die Bindungsfähigkeit an das L-Selectin wichtig sind. Da Heparitinase, ein Heparansulfat abbauendes Enzym, die L-Selectinbindung ebenfalls hemmte, kann vermutet werden, daß auch Proteoglykane an der L-Selectinbindung der auf kardialen mikrovaskulären Endothelzellen exprimierten Liganden beteiligt sind.

*In vivo* und *in vitro* Untersuchungen anderer Autoren hatten gezeigt, daß auch im Bereich des Gefäßsystems L-Selectin abhängige Adhäsion nachweisbar ist ([129](#), [143](#), [148](#), [240](#)). Im Gegensatz zu den übereinstimmenden funktionellen Daten über L-Selectin abhängige Adhäsion an vaskulären Endothelzellen ist die Identität der Liganden aus dem Gefäßbereich jedoch noch nicht geklärt.

Die hier dargestellten Untersuchungen zeigten ebenfalls, daß L-Selectin abhängige Adhäsion an humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen nachweisbar war, allerdings nicht an

ruhenden, unstimulierten Endothelzellen, sondern erst nach Stimulation der Endothelzellen mit  $\text{TNF}\alpha$ . Die Tatsache, daß an nicht stimulierten Endothelzellen keine L-Selectin abhängige Adhäsion nachweisbar ist, charakterisiert einen wichtigen Unterschied der L-Selectin abhängigen Adhäsion zwischen kardialen Endothelzellen und HEV des Lymphgewebes. Die bisher bekannten Liganden auf HEV werden konstitutiv exprimiert, eine Modulation durch Zytokine, wie auf vaskulären Endothelzellen, ist bisher nicht berichtet worden ([113](#), [257](#)).

Während CD40 Stimulation die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 sowie auch die E-Selectin abhängige Adhäsion ähnlich induziert wie  $\text{TNF}\alpha$  (siehe Seite 74), induzierte die Stimulation des  $\text{TNF}\alpha$  Rezeptor-ähnlichen CD40 Rezeptors keine vermehrte Adhäsion der NALM6-L Zellen.

In anderen Zellsystemen ist gezeigt worden, daß sich die Signaltransduktion des CD40- und des  $\text{TNF}\alpha$  Rezeptors unterscheiden ([55](#), [82](#), [230](#)). Möglicherweise ist die Signaltransduktion des  $\text{TNF}$ - und des CD40 Rezeptors auch in Endothelzellen unterschiedlich und kann als eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Fähigkeit von  $\text{TNF}\alpha$  und CD154, L-Selectin abhängige Adhäsion zu induzieren, angesehen werden.

Stimulation mikrovaskulärer Endothelzellen in Anwesenheit von Cycloheximid hemmte die Induktion L-Selectin abhängiger Adhäsion durch  $\text{TNF}\alpha$ . Cycloheximid hemmt die Proteinbiosynthese auf der Ebene der Translation ([166](#)). Die Hemmung der Adhäsion durch Cycloheximid weist darauf hin, daß die Induktion der Adhäsion mit Proteinsynthese einhergeht. Dies kann bedeuten, daß die Synthese des Liganden selbst gehemmt wird. Alternativ wäre auch denkbar, daß der Ligand bereits synthetisiert in der Zelle vorliegt und durch  $\text{TNF}\alpha$  Stimulation den Liganden prozessierende Enzyme, z.B. glykolisierende Enzyme, induziert werden, die die funktionell aktive Form des Liganden fertigstellen, bevor er an die Zellmembranoberfläche transportiert wird.

Als L-Selectin Liganden des Lymphsystems sind GlyCAM-1 ([135](#)), MadCAM-1 ([229](#)) CD34 ([16](#)) und Podocalyxin-like protein ([208](#)) identifiziert worden. Diese Liganden sind mucinähnliche, stark glykolisierte Proteine. Neben diesen Glykoproteinen können aber offensichtlich auch Glykolipide als Liganden des L-Selectins fungieren ([6](#), [118](#)). Da der auf

kardialen mikrovaskulären Endothelzellen exprimierte L-Selectin Ligand jedoch durch milde Trypsinbehandlung inaktiviert wurde (siehe Seite 93), spricht dies dafür, daß der L-Selectin Ligand kein Glykolipid, sondern ein Protein ist.

Ein gemeinsames Charakteristikum der L-Selectin Liganden GylCAM-1, MadCAM-1 und CD34 ist ihre starke Glykosilierung ([213](#)). Diese mucinähnlichen Liganden exprimieren alle das MECA79 Epitop, eine Zuckerstruktur, in der sulfatierte Komponenten für die Bindung des MECA79 Antikörpers und ihre Funktion als L-Selectin Ligand notwendig sind ([103](#)). Dies erklärt auch, daß Hemmung der Sulfatierungsreaktionen mit einem Aktivitätsverlust der L-Selectin Liganden einhergeht ([112](#)). Weiterhin zeichnen sich diese Liganden dadurch aus, daß O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide für die L-Selectinbindung wichtig sind. Diese Glykanstrukturen können durch das Enzym O-Glykoprotein-Endopeptidase (OSGP) abgespalten werden und inaktivieren damit die mucinähnlichen L-Selectin Liganden ([81](#), [225](#)). Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-haltige Zucker sind weitere Komponenten der Selectinliganden. Diese werden von OSGP jedoch nicht gespalten, wie von Ley et al. ([144](#)) gezeigt wurde. Neuraminidase, gewonnen von *Clostridium perfringens*, spaltet dagegen die Sialyl-Lewis<sup>x</sup> haltigen Zuckerkomponenten ([97](#), [255](#)) und inaktiviert so ebenfalls L-Selectin Liganden ([239](#)). Im Gegensatz zu diesen an den mucinähnlichen Liganden beobachteten Befunden hatten weder OSGP noch Neuraminidase einen hemmenden Effekt auf die L-Selectin abhängige Adhäsion an mikrovaskulären Endothelzellen. Das läßt vermuten, daß weder O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide noch Sialyl Lewis<sup>x</sup> haltige Zuckerkomponenten für die Funktion der L-Selectin Liganden auf kardialen mikrovaskulären Endothelzellen von Bedeutung sind. Allerdings sind kürzlich auch L-Selectin Liganden im Lymphsystem beschrieben worden, die unempfindlich gegen OSGP waren ([50](#)). Auch auf Lymphozyten konnten Liganden identifiziert werden, die unempfindlich gegen Neuraminidasebehandlung waren ([205](#)) und damit wahrscheinlich ebenfalls einer anderen Gruppe von Molekülen angehören, als die bisher bekannten Liganden des Lymphgewebes.

Norgard-Sumnicht et al ([176](#)) und Koenig et al ([129](#)) hatten beschrieben, daß L-Selectin abhängige Adhäsion durch Heparine gehemmt werden könne. Dies gab zu der Vermutung Anlaß, daß Proteoglykane vom Heparansulfattyp als Liganden für L-Selectin fungieren

könnten. Norgard-Sumnicht et al. konnten zudem nachweisen, daß sowohl zellgebundene als auch sezernierte Proteoglykanfraktionen auftreten, die an L-Selectin binden. Es waren selten vorkommende, an den Aminogruppen nicht substituierte Heparansulfate ([175](#)). Allerdings konnte keine Abhängigkeit der Heparansulfatbildung von einer Stimulation der Endothelzellen, in diesen Versuchen mit Lipopolysacchariden, festgestellt werden.

In die gleiche Richtung weisen Untersuchungen von Guiffre et al. ([79](#)), die zeigten, daß die Adhäsion von Monozyten an TNF $\alpha$  stimulierten bovinen aortalen Endothelzellen durch Behandlung der Endothelzellen mit Heparitinase, einem Heparansulfat abbauendem Enzym, zum größten Teil gehemmt werden konnte. Unter den gewählten Bedingungen waren 60-80% der Monozytenadhäsion L-Selectin abhängig und 80% der L-Selectin abhängigen Adhäsion durch Heparitinase I hemmbar.

Um zu überprüfen, ob der auf mikrovaskulären kardialen Endothelzellen exprimierte putative L-Selectin Ligand gegen Heparansulfat abbauende Enzyme empfindlich ist, wurden die Endothelzellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$  mit Heparitinase I, einem Heparansulfat abbauenden Enzym, und Heparinase I, einem Heparin abbauenden Enzym, inkubiert. Nach Vorbehandlung mit Heparitinase I konnte eine signifikante Hemmung der L-Selectin abhängigen Adhäsion beobachtet werden. Inkubation unter den gleichen Bedingungen mit Heparinase I zeigte keine Hemmung der Adhäsion. Dies läßt vermuten, daß Heparansulfate an der L-Selectin abhängigen Bindung beteiligt sind. Auch die Beobachtung, daß Tunicamycin die Adhäsion hemmt (siehe Seite 89), unterstützt diese Vermutung, da gezeigt worden war, daß Tunicamycin die Bildung von Proteoglykanen inhibiert ([227](#), [263](#)). Ob der Ligand selbst ein Heparansulfat ist oder ob Heparansulfate den Liganden, ähnlich wie es für das Chemokin IL-8 beschrieben worden ist ([219](#), [258](#)), an der Zelloberfläche präsentieren, ist anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht zu entscheiden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit Hilfe der mikrovaskulären kardialen Endothelzellen ein System vorhanden ist, mit dem L-Selectin abhängige Adhäsion *in vitro* unter Flußbedingungen nachweisbar ist. Es erlaubt, die Liganden, die auf diesen Endothelzellen exprimiert werden, zu charakterisieren. L-Selectin abhängige Adhäsion ließ sich – im Gegensatz zu hochendothelialen Venolen - nicht an unstimulierten ruhenden Endothelzellen

nachweisen, sondern erst nach Stimulation mit dem inflammatorischen Zytokin  $\text{TNF}\alpha$ . Stimulation des  $\text{TNF}\alpha$  Rezeptor ähnlichen CD40 Rezeptors induziert keine L-Selectin abhängige Adhäsion. Der auf kardialen mikrovaskulären Endothelzellen exprimierte Ligand unterscheidet sich von bisher bekannten mucinähnlichen Liganden auf hochendothelialen Venolen des Lymphgewebes, da er unempfindlich gegen O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase und Neuraminidase ist. Der Ligand enthält wahrscheinlich Proteinanteile, an den N-glykosidisch Zuckerseitenketten, z. B. Glykane vom Heparansulfattyp, gebunden sind.

## **6 Material und Methoden**

### **6.1 Isolierung humaner kardialer mikrovaskulärer Endothelzellen (HMCEC)**

#### **6.1.1 Präparation**

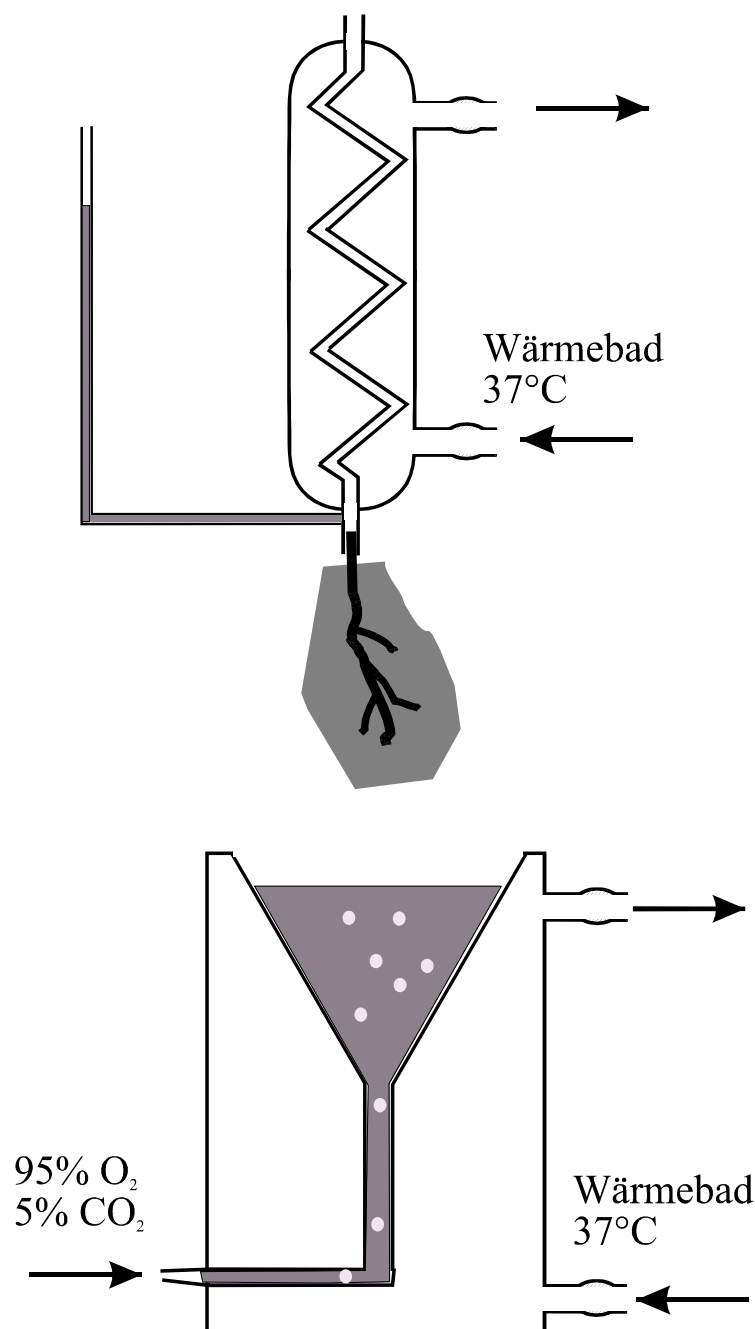
Explantierte humane Herzen von Patienten im Endstadium einer dilatativen Kardiomyopathie wurden für die Gewinnung mikrovaskulärer Endothelzellen verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurde ein ca. 6 x 8 cm großes Myokardstück aus dem Bereich der Herzspitze herauspräpariert. Es wurde ein ca. 2 cm langer Gefäßabschnitt zur Kanülierung und Perfusion belassen. Die Präparate wurden in 4°C kalter Ringerlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) bis zur Bearbeitung aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung erfolgte innerhalb von maximal 24 Stunden. Innerhalb dieser Zeit konnte keine Veränderung in der Zellausbeute beobachtet werden. Zur weiteren Isolierung der Endothelzellen wurde das Präparat in eine modifizierte Langendorffapparatur eingehängt.

In sterilen Perfusionsleitungen (Typ N, Luer-Lock, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wurde mit Hilfe einer Rollpumpe (Ismatec SA Laboratoriumstechnik, Zürich, CH) die Perfusionsflüssigkeit zunächst in einen Temperaturaustauscher (Anfertigung durch Glasbläser nach Angabe) und dann in das Gewebestück geleitet. Die abtropfende Flüssigkeit wurde nach der Gewebepassage in einem temperierten Trichter (Anfertigung durch Glasbläser nach Angabe) aufgefangen und dem Kreislauf erneut zugeführt (siehe Abb. 6.1).

Die Anschlüsse der Leitungssysteme an die Glaswaren wurden mit Hilfe von ca. 4 cm langen Schlauchstücken (Tygon, Norton, Bezug über Merck, Berlin) über Rotieradapter (Berg Medizintechnik GmbH, Berlin) durchgeführt. Am Ausgang des Wärmetauschers wurde eine



weitere Perfusorleitung als Druckmesseinrichtung über einen Dreiwegehahn (Connecta, Pfrimmer-Viggo GmbH + Co KG, Erlangen) angeschlossen. Der Perfusionsdruck wurde in Zentimeter Wassersäule gemessen. Während der gesamten Perfusion des Gewebes erfolgte eine Begasung der eingesetzten Flüssigkeiten mit Carbogengas (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, AGA Edelgas GmbH, Berlin). Abbildung 6.1 verdeutlicht den Aufbau der hier verwendeten Perfusionsanlage.



**Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung des Aufbaus zur Perfusion der Myokardstücke

Das durch eine Kanüle (Venflo 2, 1,0 mm Ø, Pfrimmer-Viggo GmbH + Co KG, Erlangen) im distalen Bereich des Ramus interventricularis anterior intubierte und in die Apparatur eingefügte Präparat wurde für wenige Minuten zuerst mit 50 ml sterilem Krebs-Henseleit Puffer (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) mit 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$  (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) und 2,1g/l Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt) bei einem pH-Wert von 7,4 perfundiert. Anschließend erfolgte die Perfusion mit 50 ml Krebs-Henseleit Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei einem Perfusionsdruck von ca. 100 cm Wassersäule. Daran schloß sich die Perfusion mit einer Enzymlösung folgender Zusammensetzung: 0,74 g/l Collagenase Typ II (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen), 0,12 g/l Trypsin 1: 250 (Serva GmbH, Heidelberg), Dispase Grad I, 50 U/ml (Collaborative Research Inc., Becton Dickinson, Heidelberg), 2000 U Dispase I (Boehringer Mannheim, Mannheim), 0,27 % Albumin (Fraktion V, 7,5 % Lösung, (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) in 50 ml Krebs-Henseleit Puffer über 20 Minuten an.

Das enzymatisch dissoziierte Gewebe wurde mit Hilfe einer Schere und eines Skalpells mechanisch zerkleinert und vom umliegenden Fettgewebe und nicht verdauten Gewebeanteilen befreit. Der Enzym/ Gewebebrei wurde nun in dem Auffangtrichtergefäß für 30 Minuten im Carbogengas Blasenstrom bei 37°C weiter zersetzt. Anschließend erfolgte eine Filtration über ein Nylonnetz mit 200 µm Porengröße (Merck, Berlin).

Die Kapillar- und Zellsuspension wurde in sterilen 50 ml Gefäßen (Falcon, Heidelberg) aufgefangen. Nach der Zentrifugation bei 200 g für 8 Minuten erfolgte das Absaugen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets mit Zellkulturmedium.

Das benutzte Zellkulturmedium für humane mikrovaskuläre Endothelzellen und makrovaskuläre koronare Endothelzellen wurde aus folgenden Substanzen zubereitet: Medium 199 Earle (2,2 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , Seromed, Biochrom KG, Berlin), 20 % fötales Kälberserum (Seromed, Biochrom KG, Berlin), 200 mM Glutamin (Seromed, Biochrom KG,

Berlin), 100 U/ml Penicillin (Grünenthal GmbH, Stollberg), 100 µg/ml Streptomycin (Sigma, Deisenhofen), 10 mM/l HEPES (Sigma, Deisenhofen), sowie 1 % Retina Derived Growth Faktor (RDGF, eigene Herstellung nach (80)) oder 10 ng/ml Endothelial Cell Growth Factor (ECGF, Boehringer Mannheim, Mannheim).

Die Zellsuspension wurde auf mit 0,2 % iger Gelatine beschichteten Zellkulturgefäßen (T 75, 250 ml, Falcon, Heidelberg) ausgesät und in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft inkubiert.

Nach der Adhäsion der Endothelzellen erfolgte das Spülen der Zellkultur nach max. 24 Stunden zum Entfernen von nicht anhaftenden Zellen, wie Kardiomyozyten oder Erythrozyten. Hierbei wurde der Kulturüberstand abgesaugt und die Kultur mit 10 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gespült. Nach Wiederauffüllen mit 10 ml Zellkulturmedium erfolgte erneut die Inkubation im Brutschrank. Im weiteren wurde die Zellkultur zweitägig mit frischem Medium versorgt.

## **6.2 Isolierung humaner kardialer makrovaskulärer Endothelzellen (CEC)**

### **6.2.1 Präparation**

Zur Gewinnung makrovaskulärer koronarer Endothelzellen wurden aus explantierten Herzen unter sterilen Bedingungen Koronargefäße herauspräpariert und in 25 ml Medium 199 mit Penicillin/ Streptomycin/ Hepes Zusatz bei 4°C für max. 24 Stunden gelagert. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, möglichst lange, unverletzte und mit wenig Abzweigungen versehene Gefäßabschnitte zu erhalten.

Die Koronargefäße wurden im Labor mit Hilfe eines Mikropräparationsbesteckes vom umliegenden Fettgewebe befreit und in 10 ml Medium 199 mit 0,2 % Collagenase (Collagenase II, Sigma Chemie, Deisenhofen) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Gefäßabschnitte erneut mehrfach mit Medium 199 durchspült, um

die abgelösten Zellen aus den Koronararterien herauszuspülen, und die Zellsuspension wurde bei 200 g für 5 Minuten. zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets mit 5 ml Zellkulturmedium erfolgte das Aussäen auf eine Kulturflasche (T25, Falcon, Heidelberg). Die weitere Versorgung erfolgte wie unter für mikrovaskuläre Endothelzellen angegeben.

### **6.3 Anreicherung von humanen Endothelzellkulturen**

Polystyrene paramagnetische Kügelchen (Dynabeads M-450, Dynal, Hamburg) mit 4,5 µm Durchmesser, 3-5 m<sup>2</sup>/g Oberfläche, wurden vom Hersteller durch p-Toluenesulfonylchlorid zur Proteinbindung aktiviert. Sie wurden an das Lektin Ulex Europaeus I (Sigma, Deisenhofen) gekoppelt, entsprechend den Angaben des Herstellers ([247](#)).

Eine von der Kulturschale mit Trypsin/EDTA abgelöste Zellsuspension wurde mit ca. 1 ml Medium 199 und 15 µl Ulex Europaeus I gekoppelten Dynabeads gemischt (angestrebtes Zell- Dynabeads - Verhältnis für die Positivtrennung lag bei 10:1), für 30 Minuten. bei 4°C rotiert und anschließend gesammelt.

Die an Endothelzellen gekoppelten Dynabeads wurden mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert und auf T 75 Kulturgefäße ausgesät. Dieser Reinigungsschritt erfolgte routinemäßig während der 1. Zellpassage, sowohl für mikro- als auch für makrovaskuläre koronare Endothelzellen.

## 6.4 Charakterisierung von humanen Endothelzellen

Zur Charakterisierung humaner Endothelzellen wurden sowohl lichtmikroskopische, als auch fluoreszenzmikroskopische Verfahren herangezogen.

Die auf 3,5 cm Durchmesser (ca. 10 cm<sup>2</sup> Kulturfläche, Falcon, Heidelberg) Kulturschalen gezüchteten Endothelzellen wurden in unbehandeltem Zustand im Phasenkontrast bei 20 facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien (Pflastersteinrelief, Zellmonolayer) beurteilt. Für den Nachweis humaner endothelzellspezifischer Antigenstrukturen auf Endothelzellen wurde die Immunfluoreszenz Mikroskopie eingesetzt.

Auf gekammerten, beschichteten Objektträgern (Chamber Slide, 8 well, Nunc Inc., Heidelberg) wurden kultivierte Endothelzellen in einer -20°C kalten Methanollösung (Merck, Darmstadt) für 20 Minuten bei -20°C fixiert und anschließend mit PBS (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) über 10 Minuten bedeckt. Nach Entfernen der PBS-Lösung erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Primäantikörper (100 µl/ Kammer der im folgenden angegebenen Verdünnungen) für 45 Minuten.

Eingesetzt wurden folgende Primäantikörper:

- - Anti-Faktor VIII Related Antigen, Verdünnung 1:50 (Anti-F VIII R:AG, Dakopatts, Hamburg),
- - Clotimmun-Anti-Hämophiles Globulin-assoziertes Protein/Faktor VIII R: AG, Verdünnung 1: 50 (Behringwerke AG, Marburg).
- - Anti-Endothelzell-Antikörper 1915, Verdünnung 1:50 (MAB 1915, Chemicon, Biermann GmbH, Bad Nauheim),
- - Anti-CD 31 Antikörper, Verdünnung 1:50 (Anti-CD 31, Dianova, Hamburg).

Verdünnungen der Antikörper wurden mit Aqua destillata mit 0,1 % fötalem Kälberserum durchgeführt. Nach dreimaligem Spülvorgang für je 5 Minuten mit PBS (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>)

erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für ebenfalls 45 Minuten. Als zweite Antikörper wurden benutzt:

- - Anti-Maus polyvalentes Ziegen Immunglobulin FITC-konjugiert, 1:20 (Sigma, Deisenhofen),
- - Anti-mouse Biotin, 1:100 (Dianova, Hamburg).

Bei FITC (Fluorescein Isothiocyanat) gekoppelten zweiten Antikörpern erfolgte eine dreimalige Spülung für 5 Minuten mit PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ), eine Bedeckung des Präparates mit Aqueous Mounting Medium (Shandon Southern Products Ltd., GB) und einem Deckglas. Die Präparate wurden unter der Anregung bei 490 nm im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Bei der Verwendung des Anti-Maus Biotin Antikörpers als zweiten Antikörper folgte nach dreimaligem Spülvorgang für 5 Minuten mit PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) die Inkubation mit Streptavidin-Rhodamin. 100 µl des 1:200 verdünnten Streptavidin-Rhodamin Farbstoffkomplexes (Dianova, Hamburg) wurden für 45 Minuten auf das Präparat gebracht. Nach erneutem dreimaligen Spülen mit PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) erfolgte wiederum das Eindecken und das Bedecken mit einem Deckglas. Die mikroskopische Beurteilung wurde, durch Licht der Wellenlänge 540 nm angeregt, im Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

Als weiteres Charakteristikum der Endothelzellen wurde die Aufnahme von acyliertem LDL in die Zellen herangezogen.

Auf gekammerten Objekträgern kultivierte Endothelzellen wurden mit 10 µg/ml Dil-Ac-LDL (Dil-Ac-LDL, Paesel und Lorei, Frankfurt/Main) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, mehrmals mit frischem Medium gespült, dreimal mit PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und für 20 Minuten in 3,7 %-iger Formaldehydlösung (Verdünnung in PBS) bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Spülen mit Aqua destillata erfolgte das Eindecken und Auflegen eines Deckglases. Die Auswertung erfolgte durch Anregung bei 540 nm im Fluoreszenzmikroskop.

## 6.5 Immunhistologie

Herzgewebe wurde in neutralem 10% Formalin fixiert, in Paraffin gebettet und 2µm dicke Schnitte angefertigt. Es folgte eine Entparaffinierung in Xylen, mit reinem Aceton und 30% Aceton in Tris-Puffer (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7.4). Für die Färbung mit Antikörpern gegen von Willebrandt Faktor erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit 0,1% Pronase (Merck, Darmstadt). Folgende Antikörper wurden zur Charakterisierung des Herzmuskelgewebes verwendet:

- Anti- von Willebrandt Faktor (1:50 Dakopatts, Glostrup, Dänemark)
- Anti-CD31 (1:25, Klon JC70 Dakopatts, Glostrup, Dänemark)
- Ulex Europaeus-I Lektin (1:300, Sigma, Deisenhofen)

Endogene alkalische Phosphatase Aktivität wurde durch 1 mM Levamisol (Sigma, Deisenhofen) geblockt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem APAAP Detektionssystem entsprechen Cordell ([54](#)). Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin gegengefärbt.

Die Detektion der alkalischen Phosphatase Aktivität erfolgte mit einem Kit zum Nachweis alkalischer Leukozyten Phosphatase wie bei Spänel-Borowski et al. ([218](#)) beschrieben. Herzmuskelgewebe wurde dazu mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt, mit 100% Aceton fixiert und bei Raumtemperatur über 10 Minuten getrocknet. Aus Zellkulturen gefertigte Präparate wurden mit 3,8% Formalin in reinem Methanol fixiert.

Es erfolgte nun eine Inkubation mit der α-Naphthyl Phosphat enthaltenen Reaktionslösung über 15 Minuten, gefolgt von einer Färbung mit Neutralrot. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer tiefroten Anfärbung.

## 6.6 Isolierung von Low Density Lipoproteinen (LDL)

### 6.6.1 LDL Präparation

Humanes Vollblut von freiwilligen Probanden wurde zur Antikoagulation und zum Schutz vor Autooxidation ([107](#)) direkt nach der Entnahme mit 1mg/ml EDTA versetzt. Nach der Zentrifugation mit 1200 g für 10 Minuten, zur Trennung von Plasma und zellulären Bestandteilen, erfolgte die Lagerung des Plasma für max. 7 Tage bei 4°C.

LDL (Dichte 1,019-1,063 g/ml) wurde aus dem so gewonnenen Plasma durch schrittweise Ultrazentrifugation nach der Methode von Havel et al. ([101](#)) über einem Kalium-Bromid Gradienten isoliert. Das isolierte LDL wurde in einem Reagenzglas bei 4°C für max. 3 Wochen zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Nach der Isolierung der LDL erfolgte eine Konzentration durch Zentrifugenultrafiltration (Centricon 30, Ausschlußgrenze 30 KDa, Amicon, Witten) bei 1200 g/min. für 40 Minuten. und eine Reinigung über eine Gelfiltrationssäule.

In einer HiLoad 16/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule (Pharmacia LKB Biotechnology, Freiburg), äquibriert mit Tyrode Lösung (pH=7,4), Gibco BRL Life Technologies GmbH, Berlin) + 0,2 mM EDTA und 20 µM BHT (Butylhydroxytoluene, Sigma, Deisenhofen), erfolgte die Reinigung der LDL ([108](#)) durch das Prinzip unterschiedlicher Molekülradien. Die in einem Vorratsbehälter befindliche Pufferlösung wurde mit einer Rollerpumpe (Ismatec SA Laboratoriumstechnik, Zürich, CH.) durch die Gelfiltrationssäule gepumpt und in einem Probenfraktionierer (Waters fraction collector, Millipore) in 1,2 ml Fraktionen aufgefangen.

Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm in einem Spektrometer (Unicam 8625 UV/VIS Spectrometer, Unicam Limited, GB) gemessen. Der Maximalpunkt der Absorptionen bei 280 nm entsprach der LDL-Fraktion. Im Anschluß an diese Aufarbeitung erfolgte eine modifizierte Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry et



al. ([147](#)).

Probenaliquots (1 mg/ml LDL Protein) wurden mit einem 0,22 µm Sterilfilter steril filtriert und im Dunkeln bei 4°C für maximal 4 Wochen in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gelagert.

### **6.6.2 LDL Charakterisierung**

Zum Nachweis der LDL wurden folgende Methoden angewandt:

1. Agarose Gelelektrophorese
2. Cholesterin/Triglyceridquotient

#### **6.6.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit dem Lipidophor ALL IN 12 System (Immuno GmbH, Heidelberg) durchgeführt.

Die Auftragungsstelle des Agarosemediumträgers wurde mit 10 µl eines Gemisches aus LDL/Plasma und Agarosemedium im Verhältnis 1:1 vol/vol bestückt. Nach dem Aufbringen des Versiegelungsmediums (ca. 2 µl) auf die Auftragsstelle wurde der Agarosemediumträger in die mit Kammerpuffer (je 300 ml) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und diese verschlossen. Der Kammerpuffer bestand aus folgenden Substanzen: 62,1 % (g/g) 5,5'-Diethylbarbitursäure Natriumsalz, 29,2 % (g/g) Natriumacetat und 8,7 % (g/g) Zitronensäure. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei 2 Gelträgern (4 Proben) mit konstantem Strom von 30 mA für 80 Minuten.

Im Anschluß daran erfolgte das Aufbringen von 5 ml Entwicklerlösung 1, nach 30 Minuten. Inkubationszeit Aufbringen der Entwicklerlösung 2 (5 ml zur Klärung der Träger). Die Entwicklerlösung 1 enthielt folgende Substanzen: 7 mmol Phosphorwolframsäure, 0,2 mol Magnesiumchlorid, 0,15 mol Natriumchlorid und 15 mmol Natriumazid. Entwicklerlösung 2 bestand aus 7 mmol Phosphorwolframsäure und 0,3 mol Natriumchlorid.

Die Beurteilung der Gelträger erfolgte nach 30 Minuten gegen einen dunklen Hintergrund. Laufstreckenunterschiede wurden mit einem Lineal ausgemessen.

#### **6.6.2.2 Cholesterin und Triglyceridbestimmung**

Die Cholesterin und Triglyceridbestimmung erfolgte in einem Hitachi Großlaborgerät (Hitachi System 717). Zum Cholesterin- und Triglyceridnachweis wurde enzymatische Farbtestmethode ([214](#), [253](#)) verwendet.

#### **6.6.3 *Normale LDL (n-LDL)***

Als normale LDL (n-LDL) bezeichnete Lipoproteine wurden von EDTA und Antioxidantien (EDTA und BHT) mit Hilfe der Gelfiltration befreit (Verfahren wie unter Punkt *LDL Präparation* beschrieben).

Die Säule wurde jedoch mit einem 0,02 M Phosphatpuffer (pH=7,4, Natriumhydrogenphosphat, Sigma Chemie, Deisenhofen) äquilibriert. Gereinigtes LDL (Konzentration 1 mg/ml) wurde erneut steril filtriert und sofort in die Versuche eingesetzt.

#### **6.6.4 *LDL Modifizierung***

Zur Modifizierung wurde das wie unter *Normale LDL (n-LDL)* aufbereitete n-LDL verwendet (frei von Zusätzen).

##### **6.6.4.1 Herstellung oxidiertes LDL (ox-LDL)**

n-LDL wurden mit 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> (Sigma Chemie, Deisenhofen) über 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (73). Mit Hilfe der Gelfiltration wurde ox-LDL wieder von CuSO<sub>4</sub> befreit, erneut mit einem Zentrifugenkonzentrator konzentriert und anschließend steril filtriert. Die Proteinkonzentration der LDL Proben betrug 1 mg/ml. Die gewonnenen ox-LDL wurden sofort in die Versuche eingesetzt.

### **6.6.5 Nachweis der Modifizierung der LDL**

Zum Nachweis des Oxidationsgrades wurden folgende Methoden angewandt:

1. Relative Beweglichkeit in der Agarosegelelektrophorese (174, 224)
2. Fraktionierung des Apoproteins B 100 in der Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE, (224))
3. Malondialdehydgehalt der Lipoproteine in der Thiobarbitursäure Reaktiven Substanzen Methode (TBARS, (33)).

#### **6.6.5.1 Relative Beweglichkeit in der Agarosegelelektrophorese**

n - und ox-LDL Proben (10  $\mu$ l) wurden auf die Agarosegelträger des Lipidophor All IN 12 - Systems (Beschreibung unter *Agarose-Gelelektrophorese*) aufgetragen und nach dem Elektrophoreselauf zur Auswertung nebeneinander gelegt. Nach Messung des Abstandes Auftragstelle-Proteinbande wurde die relative Mobilität der verschiedenen Proben als Verhältnis zum n-LDL errechnet.

### **6.6.5.2 Fraktionierung des Apoproteins B 100**

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli et al ([133](#)) auf 4 – 20 % igen Gradientengelen (Mini-Protean II Ready Gel, Bio-Rad, München) in einer Elektrophoresekammer (Mini-Protean II Cell, Bio-Rad, München) durchgeführt.

20 µl Probe wurden 1:4 mit Probenpuffer, bestehend aus 4 ml Aqua dest., 1 ml 0,5 M Tris-HCl, pH =6,8, 0,8 ml Glycerol, 1,6 ml 10 % (w/v) SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,2 ml 1% Bromophenolblau verdünnt, für 4 Minuten auf 95°C erhitzt und bei konstant 200 V Spannung für 30 Minuten. in der Elektrophorese getrennt. Anschließend erfolgte eine Silberfärbung der Proteine ([261](#)).

### **6.6.5.3 Bestimmung des Malondialdehydgehalts (TBARS)**

Der Malondialdehydgehalt, als Ausdruck der Lipidperoxidation, gemessen mit der TBARS Methode, wurde wie folgt bestimmt :

1 ml Probe wurde mit 1 ml 0,5 %-iger Thiobarbitursäure (4,6-Dihydroxypyrimidin-2-thiol, Sigma Chemie, Deisenhofen) für 90 Minuten bei 60°C erhitzt, nach dem Abkühlen mit 1 ml 70 % iger Trichloressigsäure versetzt und mit 3 ml Chloroform gemischt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten mit 1200 g/min. wurde die optische Dichte des Überstandes bei 532 nm im Fotometer (MR 7000, Dynatech, Denckendorf) gemessen. Die Standardkurve wurde aus bekannten Konzentrationen von 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (Malonaldehyde-bis-diethylacetal, Sigma, Deisenhofen) über einen Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  –  $10^{-9}$  M in gleicher Weise ermittelt. Die Ergebnisse wurden in nmol Malondialdehyd/mg LDL Protein angegeben.

## **6.7 Endotoxinnachweis**

Zum Nachweis des Endotoxingehaltes in den LDL Aufarbeitungen (n- und ox-LDL) wurde der Limulus Amebocyte Lysate Endo-LAL Test (Chromogenix AB, Pharmacia LKB,

Freiburg) eingesetzt.

Grundlage des Testes ist eine Gelbildung durch Endotoxin im Limulus Amöbozyten Lysat (LAL), welches letztlich sichtbar ist ([141](#)). Endo-LAL wurde mit den Proben zu gleichen Teilen gemischt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Ein positives Ergebnis zeigte einen Endotoxingehalt der Proben von mindestens der Höhe der bekannten Standardkonzentrationen an.

100 µl Proben wurden mit 100 µl Endo-LAL (0,03 EU/ml) für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Eine negative Kontrolle bestehend aus 100 µl endotoxinfreiem Wasser und 100 µl einer positiven Kontrolle mit bekannten Standardkonzentrationen (0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03 EU/ml) wurden mit 100 µl Endo-LAL gemischt und ebenfalls 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Ein positives Ergebnis zeigte ein festes Gel am Grund der Probenröhrchen, ein negatives Ergebnis ein visköses Gel, bzw. keine Gelbildung. Anhand der Gelbildung und Vergleich mit den mitgeführten Kontrollen ließ sich der Endotoxingehalt der Proben in EU/ml bestimmen.

## **6.8 Messung von Gewebeplasminogen Aktivator (t-PA)**

t-PA wurde in Zellkulturüberständen mit Hilfe eines Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), in Anlehnung an das von Rijken et al ([198](#)) beschriebene Verfahren, gemessen.

Als Proben wurden die Überstände von konfluenten Kulturen, die 24 Stunden bei 37°C mit serumfreiem Medium (SFM, Gibco BRL Life Technologies GmbH, Berlin) und mit 3 - 100 µg/ml LDL-Protein inkubiert wurden, verwendet. Die Endothelzellkulturen befanden sich in der 3. Passage und wurden auf mit 0,2 %-iger Gelatine beschichteten 24er well Kulturplatten (Falcon, Heidelberg) kultiviert. Die verwendeten Überstände wurden für max. 8 Wochen bei -20°C in 1,5 ml Eppendorfcups gelagert.

Kontrollen, Standards und Proben (je 100 µl/well) wurden für 60 Minuten bei 37°C in einer

96 well Mikrotiterplatte (Falcon, Heidelberg) inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde zuvor über 24 Stunden bei 4°C mit 100 µl/well eines anti human t-PA Antikörpers (Biogenesis, Berlin) in der Verdünnung 1:10000 beschichtet. Der hierbei verwendete Puffer bestand aus folgenden Substanzen : 4,3 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,9 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 0,9 % NaCl, 200 mg/l NaN<sub>3</sub>, pH-Wert 9,5.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (je 300 µl/well) erfolgte die Zugabe von 100 µl/ well des zweiten Antikörpers (Rabbit anti human t-PA, Biogenesis, Berlin) in der Verdünnung 1:5000 und erneut eine Inkubation bei 37°C für 60 Minuten.

Der Waschpuffer setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen : 0,1 M TRIS, 0,9 % NaCl, 200 mg/l NaN<sub>3</sub>, 0,5 ml/l Tween 20, pH-Wert 7,4.

Dreimaliges Waschen, Zugabe von 100 µl/well des mit alkalischer Phosphatase gekoppelten dritten Antikörpers (Goat anti rabbit IgG-alkalische Phosphatase konjugiert, Dianova, Hamburg) in einer Konzentration von 1:2000 und erneutes Waschen schlossen sich an.

Nun wurden 100 µl/well Substratlösung (p-Nitrophenyl-Phosphat, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) der Konzentration 1mg/ml in 1 M Diethanolamin-Puffer, pH 9,8, hinzugefügt und die Absorption bei 405 nm Wellenlänge innerhalb von 30 Minuten. gemessen.

Über eine Standardkurve wurden die t-PA Konzentrationen in ng/ml ermittelt. Die Standardkurve wurde durch bekannte Konzentrationen von humanem t-PA (Boehringer, Mannheim) erstellt. Der lineare Messbereich des ELISA reichte von 0,07 - 5 ng/ml t-PA.

## **6.9 Messung von Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) Aktivität**

Die PAI-1 Aktivität wurde mit dem COATEST PAI (Chromogenix AB, Schweden, über Pharmacia LKB, Freiburg) ermittelt.

Im Überschuß zu den Proben gegebenes t-PA (40 AU/ml) bildete mit PAI-1 einen inaktiven Komplex. Das verbleibende nicht inaktivierte t-PA katalysierte unter Einwirkung eines Stimulators (humane Fibrinogenfragmente) die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Der Plasmingehalt wurde durch die Messung der amidolytischen Aktivität von Plasmin am chromogenen Substrat S-2403 bestimmt und die Freigabe von p-Nitroanilin bei 405 nm photometrisch gemessen.

In einer Standardkurve, ermittelt mit bekannten Konzentrationen von PAI (0 - 40 AU/ml), konnten die PAI Aktivitäten abgelesen werden. Die Angabe erfolgte in arbiträren Einheiten (AU/ml).

Die Kulturüberstände konfluenter Kulturen der 3. Passage wurden bei -20°C für max. 8 Wochen gelagert. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C in einem speziellen serumfreiem Medium (Serum Free Medium, SFM, Gibco BRL Life Technologies GmbH, Berlin) auf 24 er well Kulturplatten (Falcon, Heidelberg) kultiviert. Während der 24 Stunden erfolgte eine Inkubation mit 3 - 100 µg/ml LDL Protein.

## **6.10 Messung der Sekretion von Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) Antigen**

Zur Bestimmung der PAI-1 Antigenkonzentration wurde eine ELISA (Chromogenix AB, Schweden, Pharmacia LKB, Freiburg) verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 6.11 Messung der Prokoagulanten Aktivität (PKA)

Die Prokoagulante Aktivität (PKA) wurde mit Hilfe einer einfachen Koagulationsmessung ([194](#)) in einem Koagulometer (Boehringer, Mannheim) bestimmt.

Nach 24 stündiger Stimulation der Zellkulturen mit 3 -100 µg/ml LDL (siehe „*Messung von Gewebefibrinogen Aktivator (t-PA)*“) wurde das Medium entfernt und die Kulturen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) dreimal gespült. In die Versuche wurden konfluente Kulturen der 3. Passagen eingesetzt.

Je 10 cm<sup>2</sup> Kulturschale wurden 200 µl PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) hinzugefügt und es erfolgte ein fünfmaliges Einfrieren/Auftauen bei -20°C. Die Zellreste wurden danach noch mechanisch mit einem Gummischaber von der Kulturschale entfernt und in das Zellhomogenat bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt.

Die Zeitmessung wurde durch das Hinzufügen von 100 µl  $\text{CaCl}_2$  zu 100 µl Zellhomogenat bei 37°C gestartet und bei der Formation eines Thrombus gestoppt.

Kontrollen wurden ohne Zellsuspension mit einem sonst üblichen Starterreagenz (Boehringer, Mannheim, Mannheim) und  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt. Als Positivkontrolle diente gepooltes Plasma. Die Ergebnisse wurden in Sekunden (s) angegeben. Die Spezifität der Messung wurde mit einem die Gewebefaktoraktivität hemmenden Antikörper (Biotrend, Köln) bestätigt.



## **6.12 Messung der Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Aktivität aus Zellkulturüberständen von HMCEC und HCEC**

Zur Messung der ACE Aktivität in Zellkulturüberständen wurde eine fluorometrische Methode benutzt ([69](#), [121](#)).

2 Tage postkonfluente HMCEC/HCEC Kulturen der 3. Passage auf 10 cm<sup>2</sup> Kulturschalen wurden 24 Stunden in serumfreien Medium mit Lipoproteinkonzentrationen von 3 - 100 µg/ml bei 37°C inkubiert.

Nach dem Entfernen des Zellkulturüberstandes erfolgte ein dreimaliges Spülen mit folgendem Puffer: 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 11,1 mM Glucose, pH = 7,4. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml des Puffers + 5 mM/l Hippuryl-L-histidyl-leucine (H-H-L, Sigma, Deisenhofen) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 100 µl Probenvolumen wurden entnommen und mit 1,4 ml 0,5 M NaOH versetzt. Nach der Zugabe von 100 µl Reagenz 1 (o-Phtaldialdehyd, 10 mg/ml in DMSO, Sigma, Deisenhofen) und einer 5 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 250 µl 6 N HCl.

Die Fluoreszenz der Proben wurde in einem Spectrofluorometer (Shimatzu, Japan) bei einer Excitationswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 495 nm gemessen. Die SchlitzEinstellung betrug 3 nm/5 nm (Ex./Em.).

Die Standardkurve wurde mit bekannten Konzentrationen (10<sup>-4</sup> - 10<sup>-6</sup> M) von Histidyl-L-Leucine (Sigma, Deisenhofen) im gleichen Verfahren ermittelt. Die Ergebnisse wurden in Enzymaktivitäten umgerechnet und in mU/1 Mio. Zellen angegeben. 1mU Enzymaktivität stellte die Enzymmenge dar, die 1 nmol Substrat/min. bei 37°C hydrolisierte.

## 6.13 Adhäsionsassay

### 6.13.1 Aufbau der Flußkammer

Um Adhäsion unter Flußbedingungen zu untersuchen, wurde eine Flußkammer verwendet, die im Institut für Physiologie, Freie Universität Berlin, Prof. Gaehtgens entwickelt ([270](#)) und in etwas modifizierter Form neu gebaut wurde. Die Kammer bestand aus einem ausgehöhlten Plexiglasblock, der den Körper der Flußkammer darstellte. Er wurde zur Temperierung mit auf 37°C erwärmten Wassers durchspült. Auf einer Seite war in den Plexiglasblock ein Einfluß eingearbeitet, über den das Perfusionsmedium über einen Lueranschluß in die Kammer geleitet wurde. Auf der gegenüberliegenden Seite des Plexiglasblocks war der Ausfluß angeordnet. Er bestand aus einer y-förmigen Vertiefung, in der das abfließende Perfusionsmedium sich sammelte und durch einen Abflußkanal an einen Abflußschlauch, der wiederum durch einen Luerverschluss angeschlossen werden konnte, geleitet wurde. Beim Zusammenbau der Kammer wurde eine Schablone, die aus 120 µm dicker durchsichtiger Folie gefertigt worden war, auf den Plexiglasblock gelegt und durch dünne Metallstifte in der richtigen Position gehalten. Auf die Folie wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen (24 x 60 mm) gelegt, und zwar mit der Zellseite auf die Folie. Dadurch war die Kammer geschlossen und ihre geometrischen Abmessungen wurden durch die Dicke und Form der Folienschablone bestimmt. Die Form der Schablone war so gewählt worden, daß der Flußkanal anfangs eng war und sich zum Ende hin hyperbolisch aufweitete. Dadurch nahm die entstehende Wandschubspannung linear zum Ende der Kammer hin ab. Das Deckgläschen wurde durch einen abnehmbaren Schraubverschluß auf dem Plexiglasblock fixiert. Durch geeignete Wahl der Perfusionsgeschwindigkeit konnten nahezu physiologische Flußbedingungen, *in vitro* mit niedriger Reynoldszahl über dem Zellmonolayer, erzeugt werden. Die örtlich wirksame Wandschubspannung wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$\tau = 6 \eta Q (1-L/L) / (h^2 w)$$

Dabei bedeuten:

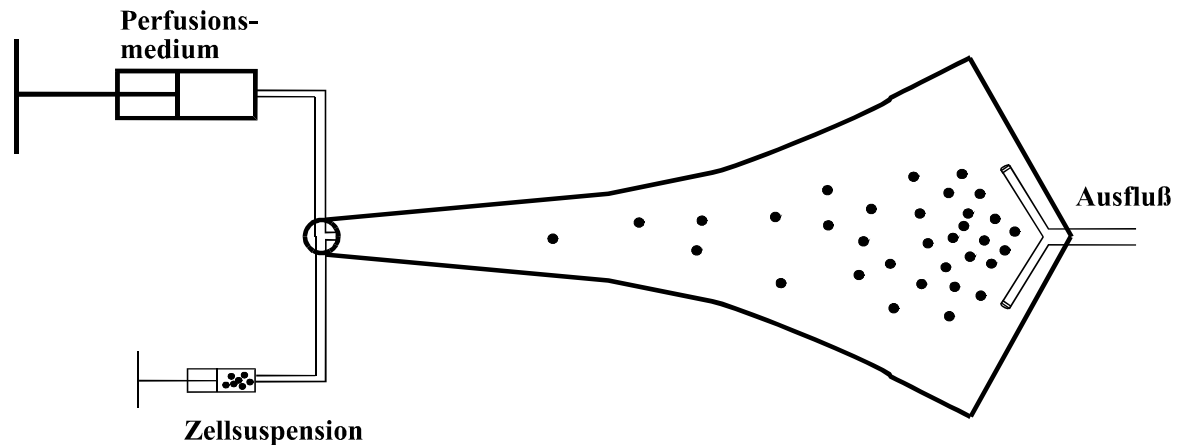
$\tau$  = Wandschubspannung,  $\eta$  = Viskosität des Perfusionsmediums (0.75 centipoise),  $Q$  =

Flußrate,  $l$  = Entfernung vom Anfang der Kammer (5 mm to 30 mm),  $L$  = Länge des Flußkanals (38 mm),  $h$  = Höhe des Flußkanals (Foliendicke, 120  $\mu\text{m}$ ),  $w$  = Weite des Kanals am Anfang der Kammer (2,2 mm). Abbildung 6.2 verdeutlicht den Aufbau der Flußkammer.

### ***6.13.2 Durchführung des Adhäsionsassays***

Zur Durchführung der Versuche wurden Zellen auf Deckgläschen, die zuvor mit  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronectin (Seromed-Biochrom, Berlin) beschichtet worden waren, ausgesät. Bei Konfluenz der Endothelzellen wurden diese entsprechend des Protokolls behandelt und dann das Deckgläschen mit der Zellseite auf die Schablone gerichtet, auf den Plexiglasblock gelegt und fixiert. Die zusammengebaute Flußkammer wurde mit der das Deckplättchen enthaltenden Seite nach unten an einem Invertmikroskop zur Beobachtung und Auswertung mittels einer Haltevorrichtung befestigt. Die Flußkammer wurde nun für ca. 5 Minuten mit Perfusionsmedium perfundiert. Das Perfusionsmedium enthielt Medium 199, 10 mM HEPES, Antibiotika und 0.1% bovines Serumalbumin (Sigma, Deisenhofen).

## Perfusionskammer



**Abbildung 6.2:** Schematische Darstellung der Flußkammer. Die Form der Kammer wurde so gewählt, daß die Wandschubspannung linear mit der Entfernung vom Anfang zum Ende der Kammer abnimmt. Die Flußgeschwindigkeit des Perfusionsmedium wurde so justiert, daß die Wandschubspannung  $2,6 \text{ dyn/cm}^2$  am Anfang und ca.  $0,6 \text{ dyn/cm}^2$  am Ende der Kammer betrug.

Der Fluß durch die Kammer wurde so gewählt, daß eine Wandschubspannung zwischen  $2,6 \text{ dyn/cm}^2$  am Anfang der Kammer und  $0,6 \text{ dyn/cm}^2$  am Ende der Kammer wirkten. In dem Zuleitungsschlauch befand sich direkt vor der Flußkammer ein Dreiwegehahn. In diesen konnte eine Zellsuspension in die Flußkammer injiziert werden. Das Totvolumen des Dreiwegehahns betrug ca.  $25 \text{ }\mu\text{l}$ , so daß jeweils  $125 \text{ }\mu\text{l}$  einer  $10^6/\text{ml}$  Zellen enthaltenden Zellsuspension injiziert wurden. Innerhalb von 5 Minuten wurde das Zellaliquott ausgespült und nach diesem Zeitraum die Zahl der fest adhärenierten Zellen bei weiter bestehender Perfusion pro Gesichtsfeld bei einer 100-fachen Vergrößerung und Anregung bei  $490 \text{ nm}$ , zur Sichtbarmachung der fluoreszenzmarkierten Zellen, ausgezählt. Es wurde die Zellzahl bei 5, 7,7, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25 und 30 mm, vom Anfang der Kammer aus gemessen, bestimmt.

### 6.13.3 *Verwendete Leukozyten*

Für die Durchführung der Adhäsionsassays wurden Zelllinien verwendet, die den Vorteil haben, bei gleichbleibenden Eigenschaften sich gut in Kultur zu vermehren. Zur Untersuchung E- und P-Selectin abhängiger Adhäsion wurden HL60 Zellen verwendet, eine promyeloische Zelllinie, die stark Sialyl Lewis<sup>x</sup> haltige Liganden für E- und P-Selectin auf ihrer Zelloberfläche exprimiert ([146](#)).

Zur Untersuchung L-Selectin abhängiger Adhäsion wurde eine prä-B Zelllinie, NALM6 Zellen, verwendet ([120](#)). Diese waren stabil mit L-Selectin transfiziert worden und wurden uns freundlicherweise vom Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin, Prof. Gaehtgens, zur Verfügung gestellt. Mock-transfizierte NALM6 Zellen dienten als Negativkontrolle. HL60 Zellen und NALM6 Zellen wurden in Suspensionskultur vermehrt. Das Medium bestand aus RPMI 1640 Medium, 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin. Zu den Kulturen transfizierter NALM6 Zellen wurde zusätzlich 200 µg/ml Geneticin (Boehringer Mannheim) gegeben.

Die in den Versuchen verwendeten Zellen wurden vor Versuchsbeginn für 30 Minuten mit  $10^{-4}$  M 5(6) Carboxyfluoreszein-Diacetat (Sigma, Deisenhofen) bei 4°C in Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit Kulturmedium gespült und auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/ ml eingestellt.

Zur Stimulation des CD40 Rezeptors wurden Endothelzellen mit P3x.TBA7 Zellen für 5 Stunden inkubiert. Prof. Kroczeck, Robert Koch Institut Berlin, stellte uns freundlicherweise diese mit CD40 Ligand (CD154) stabil transfizierte Myelomzelllinie ([84](#)) zur Verfügung. Als Negativkontrolle wurden CD154 negative Wildtypzellen, P3xWT Zellen, verwendet. Um parakrine Effekte auszuschließen, wurden die P3x Zellen zuvor mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Die P3x Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, Antibiotika und 200 µg/ml Geneticin kultiviert.

#### **6.13.4 Behandlung der Zellen für Adhäsionsassay**

Die für einen Flußkammerversuch benutzten Endothelzellen wurden auf mit Fibronektin ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichteten Deckgläschen (24 x 60 mm) ausgesät. Nachdem die Endothelzellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie mit 500 oder 1000 U/ml TNF  $\alpha$  für die Dauer von 5 Stunden stimuliert.

Um den Einfluß verschiedener Substanzen auf die Interaktion von NALM6 Zellen mit stimulierten Endothelzellen zu untersuchen, wurden Endothelzellen mit den unten angegebenen Zeiten und unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Für nachfolgende Substanzen - außer Cycloheximide - wurden außerdem Konzentrations-Wirkungs-Versuche durchgeführt, und die Substanz dann bei der wirksamsten Konzentration eingesetzt.

- a) Cycloheximide wurde in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  30 Minuten vor Stimulation mit TNF  $\alpha$  auf die Zellkultur gegeben.
- b) Tunicamycin wurde in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  30 Minuten vor Stimulation mit TNF  $\alpha$  eingesetzt.
- c) Trypsin (1:250) wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  in Medium 199 für 30 Minuten auf die Endothelzellen gegeben.
- d) Neuraminidase (*Clostridium perfringens*) wurde vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von  $0,1 \text{ U}/\text{ml}$  in PBS (angereichert mit  $0,1 \%$  bovinem Serumalbumin und  $0,25 \%$  Glucose, eingestellt auf den pH-Wert 6,3) für 60 Minuten auf die Zellen gegeben.
- e) O-Sialoglykoprotein Endopeptidase wurde entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von  $50$  und  $80 \mu\text{g}/\text{ml}$  verwendet. Die Einwirkzeit dieses Enzymes bei einer Konzentration von  $80 \mu\text{g}/\text{ml}$  betrug 60 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ .
- f) Heparinase I wurde in einer maximalen Konzentration von  $0,2 \text{ IU}/\text{ml}$  angewendet,

die Temperatur betrug 37 °C, der pH-Wert 7,4 und die Einwirkzeit 120 Minuten.

- g) Heparinase III wurde in einer maximalen Konzentration von 0,2 IU/ml verwendet, bei einer Temperatur von 37 °C, pH-Wert 7,4 und einer Einwirkzeit von 120 Minuten.

Nach Ablauf der jeweiligen Einwirkzeit der entsprechenden Substanz wurde die Zellkultur ausgiebig gespült.

## **6.14 Zell-ELISA**

Endothelzellen der 2. und 3. Passage wurden dazu auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen (Falcon, Heidelberg) ausgesät. Bei Konfluenz der Zellen wurden diese entsprechend dem Protokoll stimuliert. Danach wurden die Platten zweimal mit PBS gespült und mit dem ersten Antikörper für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Antikörper wurden verwendet: Anti-E-Selectin (BBA2, 2 µg/ml, R&D, Bad Nauheim), Anti-VCAM-1 (BBA5, 5 µg/ml, R&D Bad Nauheim), Anti-ICAM-1 (BBA3, 5 µg/ml, R&D Bad Nauheim), Anti-CD31 (20 µg/ml, Dianova, Hamburg). Daraufhin erfolgte ein dreimaliges Spülen mit PBS, gefolgt von der Inkubation mit einem alkalische Phosphatase markiertem anti-Maus Antikörper (0.3 µg/ml Sigma, Deisenhofen), wiederum für 30 Minuten bei 37°C. Es schloß sich ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS an und die Inkubation mit 100 µl 3,8 mM p-Nitrophenyl-Phosphat in 1 M Diethanolamin-Puffer, pH 9.8. Nach 30-45 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die Auswertung in einem ELISA Meßgerät (MR7000) bei 405 nm.

## **6.15 RT-Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die zu untersuchenden Zellen wurden hierzu auf mit Gelatine beschichteten 35 mm Kulturschalen ausgesät und bei Konfluenz entsprechend dem Protokoll stimuliert. Die Zellen

wurden dann mit Trypsin/ EDTA von den Kulturschalen abgelöst, mit 200 g zentrifugiert und das Pellet bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung aufgehoben. Totale RNA wurde nach der von Chomczynski und Sacchi (48) beschriebenen Methode isoliert. cDNA wurde durch reverse Transkription mit dem Enzym M-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO BRL, Berlin, Germany) unter Verwendung von oligo (dT) Primern in einem Reaktionsvolumen von 20µl bei 42°C über 50 Minuten synthetisiert. Die nachfolgende PCR wurde auf einem Perkin Elmer DNA Cycler (PE 9600 Perkin Elmer, Überlingen) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte als Duplex PCR in 25 µl Reaktionsvolumen. Für jedes verwendete Primerpaar erfolgte eine gesonderte Optimierung der Reaktion. Die Reaktionsbedingungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

	E-Selectin	VCAM-1	ICAM-1	PDH
Primermenge (pM)	8 pM	8 pM	16	16
DNTPs (µM)	200	200	200	200
MgCl (mM)	2,5	3,5	2,5	.-
Amplifikatlänge (mRNA) (Basenpaare)	254	523	215	103
Amplifikatlänge (DNA) (Basenpaare)	380	667	300	185
Zyklenzahl	26	25	28	.-



5 µl der Amplifikatlösung wurden in einem 3% Agarosegel elektrophoretisch in TBE-Buffer (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, pH 8,0) getrennt und mit 0.5 µg/ml Ethidium Bromid getrennt. Zur weiteren quantitativen Auswertung der PCR Reaktion wurde die Amplifikatlösung durch HPLC analysiert. Dazu wurden 20µl Amplifikatlösung mit 80µl Aqua dest. über einer TSK-DEAE Säule (3.5 x 4.6 mm, Perkin Elmer, Überlingen) aufgetrennt wie bei Katz und Haff ([124](#)) beschrieben. Die Elution erfolgte mit einem Trishydroxy-Aminomethan/NaCl, pH 9,0 Gradienten. Das Eluat wurde photometrisch ausgewertet und die Mengen der Amplifikatprodukte durch Integration der Elutionskurve bestimmt. Das Verhältnis der Amplifikationsprodukte PDH zu E-Selectin, VCAM-1 oder ICAM-1 wurde für die Auswertung verwendet.

## 6.16 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Zahl der durchgeführten Versuche wurde mit n angegeben. Bei jedem Versuch wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, bei Adhäsionsversuchen erfolgten Doppelbestimmungen. Die Ergebnisse mehrerer Versuche wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede wurde zunächst die Normalverteilung der Daten nach Komogorov-Smirnov für kontinuierliche Variablen ([102](#)) überprüft. Alle Versuchsergebnisse der verwendeten Versuche waren normal verteilt. Es schloß sich dann bei Vergleich von 2 Meßwerten ein Student-T-Test ([7](#)) an, bei Vergleich mehrerer Meßwerte eine Multivarianzanalyse (ANOVA) mit Korrektur nach Bonferoni ([63](#)). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn p-Werte  $< 0,05$  errechnet wurden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abdullah KM, Udoh EA, Shewen PE, Mellors A: A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. *Infect Immun* 1992;60:56-62
2. Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, Pownall H, Reilly CF, Osmundsen K, Smith CW, Ballantyne CM: Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:723-731
3. AIRE-Study-Investigators: Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. *Lancet* 1993;342:821-828
4. Allen HJ, Johnson EA: A simple procedure for the isolation of L-fucose-binding lectins from *Ulex europaeus* and *Lotus tetragonolobus*. *Carbohydr Res* 1977;58:253-265
5. Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, Batten P, Yacoub M: Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM- 1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:1064-1075
6. Alon R, Feizi T, Yuen C-T, Fuhlbrigge RC, Springer TA: Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiological flow conditions. *J Immunol* 1995;154:5356-5366
7. Armitage P, Berry G: Statistical Inference, in Armitage P, Berry G (eds): *Statistical Methods in Medical Research*. Oxford London Edinburgh Boston Palo Alto Melbourne, Blackwell, 1987, pp 104-112
8. Asakura T, Karino T: Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res* 1990;66:1045-1066
9. Auch-Schwelk W, Duske E, Hink U, Betz M, Unkelbach M, Fleck E: Vasomotor responses in cyclosporin A-treated rats after chronic angiotensin blockade. *Hypertension* 1994;23:832-837
10. Auch-Schwelk W, Kuchenbuch C, Claus M, Walter B, Bossaller C, Friedel N, Graf K, Gräfe M, Fleck E: Local regulation of vascular tone by bradykinin and converting enzyme inhibitors. *Eur Heart J* 1993;14 (Suppl I):154-160
11. Auerbach R., Alby L, Morrissey LW, Tu M, Joseph J: Expression of organ-specific

- antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res* 1985;29:401-411
12. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L: Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999;100:614-620
  13. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS: Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol* 1990;65:297-302
  14. Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL, Silverman KJ: Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984;310:175-177
  15. Bassingthwaite JB, Yipintsoi T, Harvey RB: Microvasculature of the dog left ventricular myocardium. *Microvasc Res* 1974;7:229-249
  16. Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA: Binding of L-Selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993;262:436-438
  17. Bazzoni F, Beutler B: Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: The Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Families. *N Engl J Med* 1996;334:1717-1725
  18. Berg EL, Mullowney AT, Andrew DP, Goldberg JE, Butcher EC: Complexity and differential expression of carbohydrate epitopes associated with L-selectin recognition of high endothelial venules. *Am J Pathol* 1998;152:469-477
  19. Berk BC, Corson MA: Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997;80:607-616
  20. Beutler B, Van Huffel C: An evolutionary and functional approach to the TNF receptor/ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 1994a;730:118-33:118-133
  21. Beutler B, Van Huffel C: Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 1994b;264:667-668
  22. Bevilacqua MP: Endothelial-leukozyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804
  23. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr.: Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4533-4537

24. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr.: Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985;76:2003-2011
25. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989;243:1160-1165
26. Biancone L, Cantaluppi V, Camussi G: CD40-CD154 interaction in experimental and human disease (review). *Int J Mol Med* 1999;3:343-353
27. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MAJ, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP: Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991;173:1553-1557
28. Bowman PD, Betz AL, Ar D, Wollinsky JS, Penney JB, Shivers RR, Goldstein GW: Primary cultures of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* 1981;17:353-362
29. Breslow JL, Plump A, Dammerman M: New models of lipoprotein disorder and atherosclerosis, in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and coronary heart disease*. Philadelphia, Lipincott-Raven Publishers, 1996, pp 363-378
30. Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA2: The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin.Orthop.* 1992;287-299
31. Briscoe DM, Yeung AC, Schoen EL, Allred EN, Stavrakis G, Ganz P, Cotran RS, Pober JS: Predictive value of inducible endothelial cell adhesion molecule expression for acute rejection of human cardiac allografts. *Transplantation* 1995;59:204-211
32. Brunner HR, Laragh RH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR, Bard RH, Buhler FR: Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. *N Engl J Med* 1972;286:441-449
33. Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1976;52:302-310
34. Buerke M, Weyrich AS, Murohara T, Queen C, Klingbeil CK, Co MS, Lefer AM: Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against I-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:134-142
35. Butcher EC, Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-66
36. Bühner C, Berlin C, Thiele HG, Hamann A: Lymphocyte activation and expression of the human leucocyte-endothelial cell adhesion molecule 1 (Leu-8/TQ1 antigen).

*Immunol* 1990;71:442-448

37. Cai JP, Falanga V, Taylor JR, Chin YH: Transforming growth factor-beta differentially regulates the adhesiveness of normal and psoriatic dermal microvascular endothelial cells for peripheral blood mononuclear cells. *J Invest Dermatol* 1992;98:405-409
38. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F.: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-644
39. Camera M, Giesen PL, Fallon J, Aufiero BM, Taubman M, Tremoli E, Nemerson Y: Cooperation between VEGF and TNF-alpha is necessary for exposure of active tissue factor on the surface of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:531-537
40. Campbell SM, Taha MM, Medina D, Rosen JM: A clonal derivative of mammary epithelial cell line COMMA-D retains stem cell characteristics of unique morphological and functional heterogeneity. *Exp Cell Res* 1988;177:109-121
41. Carson MP, Haudenschild CC: Microvascular endothelium and pericytes: high yield, low passage cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986;22:344-354
42. Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM: Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J Leukoc Biol* 1985;38:341-350
43. Chang MY, Sasahara M, Chait A, Raines EW, Ross R: Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. II. Cellular composition and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1631-1640
44. Chaudhari A, Kirschenbaum MA: Decreased renal preglomerular microvascular PGI<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> biosynthesis in cholesterol-fed rabbits. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989;36:81-84
45. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83:952-959
46. Cheng G, Cleary AM, Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D: Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* 1995;267:1494-1498
47. Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Hope S: Trandolapril inhibits atherosclerosis in the watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 1992;20:473-477

48. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
49. Clark EA, Ledbetter JA: Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4494-4498
50. Clark RA, Fuhlbrigge RC, Springer TA: L-Selectin ligands that are O-glycoprotease resistant and distinct from MECA-79 antigen are sufficient for tethering and rolling of lymphocytes on human high endothelial venules. *J Cell Biol* 1998;140:721-731
51. Collins T, Palmer HJ, Whitley MZ, Neish AS, Williams A.J.: A common theme in endothelial activation. *Trends in Cardiovasc Med* 1993;3:92-97
52. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transkriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kB and cytokine-inducible enhancers. *FASEB Journal* 1995;9:899-909
53. Colombo MP, Pierotti MA, Ballinari D, Parmiani G: Expression of H-2 and viral antigens and resistance to the antitumor lysis of tunicamycin-treated MBL-2 lymphoma cells. *Immunobiology* 1983;165:186-199
54. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-229
55. Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA: p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol* 1998;161:3225-3236
56. Crutchley DJ, McPhee GV, Terris MF, Canossa-Terris MA: Levels of three hemostatic factors in relation to serum lipids. Monocyte procoagulant activity, tissue plasminogen activator, and type- 1 plasminogen activator inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1989;9:934-939
57. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5134-5138
58. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr.: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-791
59. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD: Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 1999;103:1597-1604

60. Dousset V, Delalande C, Ballarino L, Quesson B, Seilhan D, Coussemacq M, Thiaudiere E, Brochet B, Canioni P, Caille JM: In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance. *Magn Reson Med* 1999;41:329-333
61. Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA: Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:601-607
62. Drexler H: Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;39:287-324
63. Dunn OJ: Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association* 1961;56:52-64
64. Duplaa C, Couffinhal T, Labat L, Moreau C, Petit-Jean ME, Doutre MS, Lamaziere JM, Bonnet J: Monocyte/macrophage recruitment and expression of endothelial adhesion proteins in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1996;121:253-266
65. Falk E, Fernandez-Ortiz A: Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol* 1995;75:5B-11B
66. Fei H, Berliner JA, Parhami F, Drake TA: Regulation of endothelial cell tissue factor expression by minimally oxidized LDL and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1711-1717
67. Feletou M, Teisseire B: Converting enzyme inhibition in isolated porcine resistance artery potentiates bradykinin relaxation. *Eur.J Pharmacol* 1990;190:159-166
68. Franke RP, Gräfe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D: Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* 1984;307:648-649
69. Friedland J, Silverstein E: A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol* 1976;66:416-424
70. Fries KM, Sempowski GD, Gaspari AA, Blieden T, Looney RJ, Phipps RP: CD40 expression by human fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:42-51
71. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326:242-250
72. Fuster V, Poon M, Willerson JT: Learning from the transgenic mouse: endothelium, adhesive molecules, and neointimal formation. *Circulation* 1998;97:16-18
73. Galle J, Bassenge E, Busse R: Oxidized low density lipoproteins potentiate

- vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle. *Circ Res* 1990;66:1287-1293
74. Galle J, Mülsch A, Busse R, Bassenge E: Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscler Thromb* 1991;11:198-203
75. Gallery EDM, Rowe J, Schrieber L, Jackson CJ: Isolation and purification of microvascular endothelium from human decidual tissue in the late phase of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:191-196
76. Geisterfer AAT, Peach MJ, Ownes G.K.: Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988;62:749-756
77. Ghaleh B, Hittinger L, Kim SJ, Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Berdeaux A, Bishop SP, Vatner SF: Selective large coronary endothelial dysfunction in conscious dogs with chronic coronary pressure overload. *Am J Physiol* 1998;274:H539-H551
78. Gibbons GH, Dzau VJ: Molecular therapies for vascular diseases. *Science* 1996;272:689-693
79. Giuffrè L, Cordey AS, Monai N, Tardy Y, Schapira M, Spertini O: Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 1997;136:945-956
80. Glaser BM, D'Amore PA, Michels RG, Patz A, Fenselau A: Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J Cell Biol* 1980;84:298-304
81. Goetz DJ, Greif DM, Ding H, Camphausen RT, Howes S, Comess KM, Snapp KR, Kansas GS, Luscinskas FW: Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J Cell Biol* 1997;137:509-519
82. Goetze S, Xi XP, Kawano Y, Kawano H, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension* 1999;33:183-189
83. Gospodarowicz D, Ill C: Extracellular matrix and control of proliferation of vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1980;65:1351-1364
84. Graf D, Korthauer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA: Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol* 1992;22:3191-3194
85. Graf D, Müller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA: A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 1995;25:1749-1754
86. Gräfe M, Auch-Schwelk W, Graf K, Hertel H, Hoffmann R, Bartsch P, Regitz-



- Zagrosek V, Friedel N, Hetzer R, Fleck E: E-selectin expression is induced by angiotensin II in human cardiac endothelial cells. *Eur Heart J* 1994;15(suppl):493-493(Abstract)
87. Gräfe M, Auch-Schwelk W, Graf K, Terbeek D, Hertel H, Unkelbach M, Hildebrandt AG, Fleck E: Isolation and characterization of macrovascular and microvascular endothelial cells from human hearts. *Am J Physiol* 1994;267:H2138-H2148
88. Gräfe M, Auch-Schwelk W, Hertel H, Terbeek D, Steinheider G, Loebe M, Fleck E: Human cardiac microvascular and macrovascular endothelial cells respond differently to oxidatively modified LDL. *Atherosclerosis* 1998;137:87-95
89. Gräfe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaetgens P, Fleck E: Angiotensin II induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* 1997;81:804-811
90. Gräfe M, Graf K, Auch-Schwelk W, Hertel H, Hoffmann R, Bartsch P, Fleck E: Modulation of adhesion molecule expression in human coronary endothelial cells. *Eur Heart J* 1993;14:58-58(Abstract)
91. Gräfe M, Steinheider G, Desaga U, Warnecke C, Lehmkuhl HB, Regitz-Zagrosek V, Hildebrandt AG, Fleck E: Characterization of two distinct mechanisms for induction of apoptosis in human vascular endothelial cells. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:505-510
92. Greenburg G, Vlodavsky I, Foidart JM, Gospodarowicz D: Conditioned medium from endothelial cell cultures can restore the normal phenotypic expression of vascular endothelium maintained in vitro in the absence of fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1980;103:333-347
93. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-1148
94. Groenen MA, Dijkhof RJ, van der Poel JJ: Characterization of a GlyCAM1-like gene (glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1) which is highly and specifically expressed in the lactating bovine mammary gland. *Gene* 1995;158:189-195
95. Hamsten A, d.Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C, Blombäck M, Wiman B: Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9
96. Han Y, Runge MS, Brasier AR: Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 1999;84:695-703
97. Hansson GC, Zopf D: Biosynthesis of the cancer-associated sialyl-Lea antigen. *J Biol*

- Chem* 1985;260:9388-9392
98. Hansson GK: Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993;69 (Suppl):S38-S41
  99. Harker LA, Ross R, Glomset J: Role of the platelet in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1976;275:321-329
  100. Harrison DG: Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997;20(Suppl):1-7
  101. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;43:1345-1353
  102. Heinhold J, Gaede K-W: Einige parameterfreie Methoden, in Heinhold J, Gaede K-W (eds): *Ingenieur-Statistik*. München Wien, R. Oldenburg Verlag, 1972, pp 300-305
  103. Hemmerich S, Butcher EC, Rosen SD: Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)- ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994;180:2219-2226
  104. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594
  105. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R: Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1145-1149
  106. Hess S, Rensing-Ehl A, Schwabe R, Bufler P, Engelmann H: CD40 function in nonhematopoietic cells. Nuclear factor kappa B mobilization and induction of IL-6 production. *J Immunol* 1995;155:4588-4595
  107. Hoffman R, Brook GJ, Aviram M: Hypolipidemic drugs reduce lipoprotein susceptibility to undergo lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis* 1992;93:105-113
  108. Hollander W, Colombo M, Paddock J: Lipoproteins in human atherosclerotic vessels. *Exp Mol Pathol* 1979;30:172-189
  109. Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A: Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp. Med.* 1995;182:33-40
  110. Holzmeister J, Ludewig B, Kroczeck RA, Frei U, Brause M, Fleck E, Regitz-Zagrosek V: Functional expression of CD40 on human coronary vascular smooth muscle cells.

*Hypertension* 1996;28:509(Abstract)

111. Howard LM, Miga AJ, Vanderlugt CL, Dal CM, Laman JD, Noelle RJ, Miller SD: Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 1999;103:281-290
112. Imai Y, Lasky LA, Rosen SD: Sulphation requirement for Glycam-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* 1993;361:555-557
113. Imai Y, Singer MS, Fennie C, Lasky LA, Rosen SD: Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol* 1991;113:1213-1221
114. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993;92:883-893
115. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-2756
116. Jaffe EA, Ross R: Synthesis of von willebrand factor by endothelial cells, in U.S. Ryan (ed): *Endothelial cells*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1988, pp 119-126
117. Johansson BB, Fredriksson K: Cerebral arteries in hypertension: structural and hemodynamic aspects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:S90-S93
118. Kanda T, Yamawaki M, Ariga T, Yu RK: Interleukin 1 beta up-regulates the expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7897-7901
119. Kane JP: Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu Rev Physiol* 1983;45:637-650
120. Kansas GS, Spertini O, Stoolman LM, Tedder TF: Molecular mapping of functional domains of the leukocyte receptor for endothelium, LAM-1. *J Cell Biol* 1991;114:351-358
121. Kapiloff MS, Strittmatter SM, Fricker LD, Snyder SH: A fluorometric assay for angiotensin-converting enzyme activity. *Anal Biochem* 1984;140:293-302
122. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS: CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4342-4346
123. Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM: Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am*

- J Pathol* 1992;140:907-914
124. Katz ED, Haff LA: Rapid separation, quantitation and purification of products of polymerase chain reaction by liquid chromatography. *J Chromatography* 1990;512:433-444
  125. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H: The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1994;1:167-178
  126. Kelm M, Preik M, Hafner DJ, Strauer BE: Evidence for a multifactorial process involved in the impaired flow response to nitric oxide in hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Hypertension* 1996;27:346-353
  127. Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE: Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* 1995;96:2515-2520
  128. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM: Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine- activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:1262-1270
  129. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A: Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest* 1998;101:877-889
  130. Kugiyama K, Sakamoto T, Misumi I, Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, Horiguchi M, Yasue H: Transferable Lipids in Oxidized Low-Density Lipoprotein Stimulate Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Inhibit Tissue- Type Plasminogen Activator Release From Endothelial Cells. *Circ Res* 1993;73:335-343
  131. Kuhn H, Belkner J, Suzuki H, Yamamoto S: Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities. *J Lipid Res* 1994;35:1749-1759
  132. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T: Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1998;83:322-327
  133. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
  134. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ, Pearson TC: Long-term

- acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381:434-438
135. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD: An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927-938
  136. Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Nalbone G, Lafont H, Juhan-Vague I: Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1821-1829
  137. Leeuwenberg JF, Jeunhomme TM, Buurman WA: Role of ELAM-1 in adhesion of monocytes to activated human endothelial cells. *Scand.J.Immunol.* 1992;35:335-341
  138. Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme, TM, Ahern TJ, Buurman WA: E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunol* 1992;77:543-549
  139. Leeuwenberg JF, von AE, Jeunhomme TM, Buurman WA: IFN-gamma regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. *J Immunol* 1990;145:2110-2114
  140. Levin EG, Miles LA, Fless GM, Scanu AM, Baynham P, Curtiss LK, Plow EF: Lipoproteins inhibit the secretion of tissue plasminogen activator from human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994;14:438-442
  141. Levin J, Bang FB: Clottable Protein in Limulus: Its Location and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 1968;19:186-197
  142. Levinovitz A, Muhlhoff J, Isenmann S, Vestweber D: Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol* 1993;121:449-459
  143. Ley K, Tedder TF, Kansas GS: L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- or P-selectin. *Blood* 1993;82:1632-1638
  144. Ley K, Zakrzewicz A, Hanski C, Stoolman LM, Kansas GS: Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood* 1995;85:3727-3735
  145. Li D, Yang B, Philips MI, Mehta JL: Proapoptotic effects of ANG II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1 receptor and PKC activation. *Am J Physiol* 1999;276:H786-H792
  146. Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend PL, Marks RM: ELAM-1 dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyl transferase cDNA. *Cell* 1990;63:475-484

147. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275
148. Luscinskas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MAJ: Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial- leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1991;146:1617-1625
149. Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum BE, Tedder TF, Gimbrone MA, Jr.: Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J Cell Biol* 1994;125:1417-1427
150. Mach F, Schönbeck U, Libby P: CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 1998;137 (Suppl):S89-S95
151. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P: Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998;394:200-203
152. Maisel AS, Harris T, Rearden CA, Michel MC: Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. *Circulation* 1990;82:2003-2010
153. Malden LT, Chait A, Raines EW, Ross R: The influence of oxidatively modified low density lipoproteins on expression of platelet-derived growth factor by human monocyte- derived macrophages. *J Biol Chem* 1991;266:13901-13907
154. Masuda J, Ross R: Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arterioscler Thromb* 1990;10:164-177
155. Masuda J, Ross R: Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arterioscler Thromb* 1990;10:178-187
156. McEvoy LM, Sun H, Tsao PS, Cooke JP, Berliner JA, Butcher EC: Novel vascular molecule involved in monocyte adhesion to aortic endothelium in models of atherogenesis. *J Exp Med* 1997;185:2069-2077
157. Meininger CJ, Granger HJ: Mechanisms leading to adenosine-stimulated proliferation of microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1990;27:H198-H206
158. Michie SA, Streeter PR, Bolt PA, Butcher EC, Picker LJ: The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. *Am J Pathol* 1993;143:1688-1698

159. Mitsuoka C, kawakami-Kimura N, Kasugai-Sawada M, Hiraiwa N, Toda K, Ishida H, Kiso M, Hasegawa A, Kannagi R: Sulfated sialyl lewis x, the putative I-selectin ligand, detected on endothelial cells of high endothelial venules by a distinct set of anti-sialyl lewis x antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:546-551
160. Montoya MC, Holtmann K, Snapp KR, Borges E, Sanchez-Madrid F, Luscinskas FW, Kansas GS, Vestweber D, de LM: Memory B lymphocytes from secondary lymphoid organs interact with E- selectin through a novel glycoprotein ligand. *J Clin Invest* 1999;103:1317-1327
161. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerrschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J: Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 1999;100:899-902
162. Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, Nishi E, Masaki T, Kita T: Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1541-1547
163. Mulligan MS, Watson SR, Fennie C, Ward PA: Protective effects of selectin chimeras in neutrophil-mediated lung injury. *J Immunol* 1993;151:6410-6417
164. Munro JM, Cotran RS: Biology of disease. The pathogenesis of atherosclerosis: Atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988;58:249-261
165. Nat Heart Lung & Blood Inst.: *Morbidity and mortality chartbook on cardiovascular, lung, and blood disease 1990*. Washington, U.S. Department of Health und Human Services, 1990,
166. Nebert DW, Gelboin HV: The role of ribonucleic acid and protein synthesis in microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture. The independence of transcription and translation. *J Biol Chem* 1970;245:160-168
167. Nees S, Gerbes AL, Gerlach.E.: Isolation, identification, and continuous culture of coronary endothelial cells from guinea pig hearts. *Eur J Cell Biol* 1981;24(Suppl):287-297
168. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP: Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-3258
169. Nelson RM, Dolich S, Aruffo A, Cecconi O, Bevilacqua MP: Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin. *J Clin Invest* 1993;91:1157-1166
170. Neuss M, Regitz-Zagrosek V, Hildebrandt AG, Fleck E: Human cardiac fibroblasts express an angiotensin receptor with unusual binding characteristics which is coupled to cellular proliferation. *BiochemBiophys Res Commun* 1994;204:1334-1339

171. Newman PJ: The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;99:3-8
172. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA: PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990;247:1219-1222
173. Nishida M, Carley WW, Gerritsen ME, Ellingsen O, Kelly RA, Smith T.W.: Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;264:H639-H652
174. Noble RP: Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res* 1968;9:693-700
175. Norgard-Sumnicht K, Varki A: Endothelial heparan sulfate proteoglycans that bind to L-selectin have glucosamine residues with unsubstituted amino groups. *J Biol Chem* 1995;270:12012-12024
176. Norgard-Sumnicht K, Varki NM, Varki A: Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science* 1993;261:480-483
177. Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A: Characterization of a specific ligand for P-selection on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 1993;268:12764-12774
178. O'Brian KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD: Vascular adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implication for the mode of progression of advanced atherosclerosis. *J Clin Invest* 1993;92:945-951
179. O'Brian KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE: Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996;93:672-682
180. Olofsson BO, Dahlen G, Nilsson TK: Evidence for increased levels of plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator in plasma of patients with angiographically verified coronary artery disease. *Eur Heart J* 1989;10:77-82
181. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989;59:1203-1211
182. Palmer-Crocker RL, Pober JS: IL-4 induction of VCAM-1 on endothelial cells



- involves activation of a protein tyrosine kinase. *J Immunol* 1995;154:2838-2845
183. Pfeffer MA, Braunwald E, on behalf of the SAVE investigators: Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;327:669-677
184. Pfeiffer A, Schatz H: Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995;103:7-14
185. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N: Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4471-4475
186. Pietinen P, Ascherio A, Korhonen P, Hartman AM, Willett WC, Albanes D, Virtamo J: Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Epidemiol* 1997;145:876-887
187. Piper HM, Spahr R, Mertens S, Krützfeldt A, Watanabe H.: Microvascular endothelial cells from heart, in H.M.Piper (ed): *Cell culture techniques in heart and vessel research*. Springer-Verlag, Berlin, 1990, pp 158-177
188. Pitt B: Angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1994;128:1328-1332
189. Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, Deedwania PC, Ney DE, Snively DB, Chang PI: Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 1997;349:747-752
190. Pober JS, Cotran RS: The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537-544
191. Pober JS, Lapierre LA, Stolpen AH, Brock TA, Springer TA, Fiers W, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Gimbrone MA, Jr.: Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 1987;138:3319-3324
192. Powell JS, Clozel J, Müller RKM, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner H.R.: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1989;245:186-188
193. Pörsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M: Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol* 1994;111:652-654
194. Prydz H, Allison C: Tissue thromboplastin activity of isolated human monocytes.

*Thromb Haemost* 1978;39:582-582

195. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB: Angiotensin II Stimulates Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 via Nuclear Factor-kappaB Activation Induced by Intracellular Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:645-651
196. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony- stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254-257
197. Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, Bauer P, Neuss M, Rolfs A, Steffen C, Hildebrandt AG, Hetzer R, Fleck E: Regulation, chamber localization and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* 1995;91:1461-1471
198. Rijken DC, Juhan-Vague I, De Cock F, Collen D: Measurement of human tissue-type plasminogen activator by a two- site immunoreactive assay. *J Lab Clin Med* 1983;101:274-284
199. Rodes J, Cote G, Lesperance J, Bourassa MG, Doucet S, Bilodeau L, Bertrand OF, Harel F, Gallo R, Tardif JC: Prevention of restenosis after angioplasty in small coronary arteries with probucol. *Circulation* 1998;97:429-436
200. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809
201. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126
202. Ross R, Glomset J, Harker L: Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977;86:675-684
203. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180:1332-1339
204. Ross R, Raines E, Bowen-Pope D: Growth factors from platelets, monocytes, and endothelium: their role in cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 1982;397:18-24
205. Sackstein R, Fu L, Allen KL: A hematopoietic cell L-selectin ligand exhibits sulfate-independent binding activity. *Blood* 1997;89:2773-2781
206. Sadoshima J, Izumo S: Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1993;73:413-423

207. Salmi M, Granfors K, MacDermott R, Jalkanen S: Aberrant binding of lamina propria lymphocytes to vascular endothelium in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 1994;106:596-605
208. Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD: Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med* 1998;187:1965-1975
209. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T: An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997;386:73-77
210. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-2258
211. Schultz Hector S, Balz K: Radiation-induced loss of endothelial alkaline phosphatase activity and development of myocardial degeneration. An ultrastructural study. *Lab Invest* 1994;71:252-260
212. Shih PT, Elices MJ, Fang ZT, Ugarova TP, Strahl D, Territo MC, Frank JS, Kovach NL, Cabanas C, Berliner JA, Vora DK: Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta1 integrin. *J Clin Invest* 1999;103:613-625
213. Shimizu Y, Shaw S: Mucins in the mainstream. *Nature* 1993;366:630-631
214. Siedel J, Hägele O, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW: Reagent for the Enzymatic Determination of Serum Total Cholesterol with Improved Lipolytic Efficiency. *Clin Chem* 1983;29:1075-1080
215. Simionescu M, Simionescu N: Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J* 1993;7:1359-1366
216. Simionescu M, Simionescu N.: Isolation and characterization of endothelial cells from the heart microvasculature. *Microvasc Res* 1978;16:426-452
217. Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Muller-Berghaus G: Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 1998;80:1008-1014
218. Spanel-Borowski K, van der Bosch J: Different phenotypes of cultured microvessel endothelial cells obtained from bovine corpus luteum. *Cell Tissue Res* 1990;261:35-47
219. Spillmann D, Witt D, Lindahl U, Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A: Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate.

- Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *J Biol Chem* 1998;273:15487-15493
220. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434
221. Springer TA: The sensation of interactions with the extracellular environment: The cell biology of lymphocyte adhesion receptors. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:359-402
222. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D: The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 1995;373:615-620
223. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-924
224. Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D: Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL: correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arterioscler Thromb* 1987;7:135-143
225. Steininger CN, Eddy CA, Leimgruber RM, Mellors A, Welply JK: The glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 eliminates binding of myeloid cells to P-selectin but not to E-selectin. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:760-766
226. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ: Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347:781-786
227. Stevens RL, Schwartz LB, Austen KF, Lohmander LS, Kimura JH: Effect of tunicamycin on insulin binding and on proteoglycan synthesis and distribution in Swarm rat chondrosarcoma cell cultures. *J Biol Chem* 1982;257:5745-5750
228. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T: The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:651-657
229. Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC: A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 1988;331:41-46
230. Sutherland CL, Heath AW, Pelech SL, Young PR, Gold MR: Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J Immunol* 1996;157:3381-3390
231. Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Lüscher TF: Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium- derived nitric oxide. *Circulation* 1991;83:2012-2020

232. Tardif J-C, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, de Guise P: Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1997;337:365-372
233. Tedder TF, Penta AC, Levine HB, Freedman AS: Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J Immunol* 1990;144:532-540
234. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P: L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med* 1995;181:2259-2264
235. Thornton SC, Mueller SN, Levine EM: Human endothelial cells: Use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 1983;222:623-625
236. Toppila S, Lauronen J, Mattila P, Turunen JP, Penttila L, Paavonen T, Renkonen O, Renkonen R: L-selectin ligands in rat high endothelium: multivalent sialyl Lewis x glycans are high-affinity inhibitors of lymphocyte adhesion. *Eur J Immunol* 1997;27:1360-1365
237. Traub O, Berk BC: Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:677-685
238. Tremoli E, Camera M, Maderna P, Sironi L, Prati L, Colli S, Piovella F, Bernini F, Corsini A, Mussoni L: Increased synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 by cultured human endothelial cells exposed to native and modified LDLs. *Arterioscler Thromb* 1993;13:338-346
239. True DD, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD: Requirement for sialic acid on the endothelial ligand of a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol* 1990;111:2757-2764
240. Tu L, Delahunty MD, Ding H, Luscinskas FW, Tedder TF: The cutaneous lymphocyte antigen is an essential component of the L- selectin ligand induced on human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1999;189:241-252
241. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM: Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:1223-1229
242. Turunen JP, Majuri ML, Seppo A, Tiisala S, Paavonen T, Miyasaka M, Lemström K, Penttila L, Renkonen O, Renkonen R: De novo expression of endothelial sialyl Lewis(a) and sialyl Lewis(x) during cardiac transplant rejection: superior capacity of a tetravalent sialyl Lewis(x) oligosaccharide in inhibiting L-selectin-dependent lymphocyte adhesion. *J Exp Med* 1995;182:1133-1141
243. Urata H, Nishimura H, Ganten D: Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens* 1996;9:277-284

244. Urata H, Nishimura H, Ganten D, Arakawa K: Angiotensin-converting enzyme-independent pathways of angiotensin II formation in human tissues and cardiovascular diseases. *Blood Press Suppl* 1996;2:22-28
245. Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE: Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992;141:1427-1433
246. van Hinsbergh VWM, Havekes L, Emeis JJ, van Corven E, Scheffer MA: Low density lipoprotein metabolism by endothelial cells from human umbilical cord arteries and veins. *Arterioscler Thromb* 1983;3:547-559
247. Vartdal F, Kvalheim G, Lea TE, Bosnes V, Gaudernack G, Ugelstad J, Albrechtsen D: Depletion of T lymphocytes from human bone marrow. Use of magnetic monosized polymer microspheres coated with T lymphocyte-specific monoclonal antibodies. *Transplantation* 1987;43:366-371
248. Vestweber D: The selectins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993;184:65-75
249. Vlodavsky I, Johnson LK, Gospodarowicz D: Appearance in confluent vascular endothelial cell monolayers of a specific cell surface protein (CSP-60) not detected in actively growing endothelial cells or in cell types growing in multiple layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:2306-2310
250. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC: Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7538-7542
251. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR: Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 1984;99:2034-2040
252. Wagner JD, St.Clair RW, Schwenke DC, Shively CA, Adams MR, Clarkson TB: Regional differences in arterial low density lipoprotein metabolism in surgically postmenopausal cynomolgus monkeys. Effects of estrogen and progesterone replacement therapy. *Arterioscler Thromb* 1992;12:717-726
253. Wahlefeld AW: Bergmeyer HU (ed): *Methoden der enzymatischen Analyse*. Weinheim, Verlag Chemie, 1974, pp 1878-1878
254. Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, Miyagawa M, Hashida K: Preventive effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1996;132:23-29
255. Watanabe M, Hirohashi S, Shimosato Y, Ino Y, Yamada T, Teshima S, Sekine T, Abe

- O: Carbohydrate antigen defined by a monoclonal antibody raised against a gastric cancer xenograft. *Jpn J Cancer Res* 1985;76:43-52
256. Watanabe Y, Ito T, Shiomi M: The effect of selective breeding on the development of coronary atherosclerosis in WHHL rabbits. An animal model for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1985;56:71-79
  257. Watson SR, Imai Y, Fennie C, Geoffroy JS, Rosen SD, Lasky LA: A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules. *J Cell Biol* 1990;110:2221-2229
  258. Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A: Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7158-7162
  259. Weber C, Erl W, Pietsch A, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber PC: Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1665-1673
  260. Weis JR, Pitas RE, Wilson BD, Rodgers GM: Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation. *FASEB Journal* 1991;5:2459-2465
  261. Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981;118:197-203
  262. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:73-82
  263. Yanagishita M: Tunicamycin inhibits proteoglycan synthesis in rat ovarian granulosa cells in culture. *Arch Biochem Biophys* 1986;251:287-298
  264. Yeh TC, Zhang W, Ildstad ST, Ho C: In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med* 1995;33:200-208
  265. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL: Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994;14:32-40
  266. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler SW, Witztum JL, Steinberg D: Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086-1095

267. Yuan C, Petty C, O'Brien KD, Hatsukami TS, Eary JF, Brown BG: In vitro and in situ magnetic resonance imaging signal features of atherosclerotic plaque-associated lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1496-1503
268. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145-153
269. Zakrzewicz A, Gräfe M, Terbeek D, Bongrazio M, Auch-Schwelk W, Walzog B, Graf K, Fleck E, Ley K, Gaehtgens P: L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood* 1997;89:3228-3235
270. Zakrzewicz A, Walzog B, Kansas GS, Tedder TF, Gaehtgens P, Ley K: L-Selectin promotes neutrophil adhesion to fibronectin and fibrinogen under condition of flow. *J Cell Biochem Suppl* 1994;18A:301-301(Abstract)
271. Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G: Immunohistological study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 1993;143:164-172



## 8 Danksagung

Besonders möchte ich meiner lieben Frau Brigitte danken, die in den letzten Jahren viel Verständnis für die langen Abende und Wochenenden im Labor aufbringen mußte und uns und unseren Kindern ein warmes Zuhause bereitet hat.

Meinen Eltern Sigrid und Manfred Gräfe sowie meinen Lehrern in der Waldorfschule Berlin bin ich zu Dank verpflichtet, da sie mein Verständnis für den Menschen erweiterten und ein eigenständiges Denken gefördert haben.

Meinem Freund Prof. Dr. Dr. Ralf-Peter Franke möchte ich danken, daß er mich in unserer „Aachener Zeit“ zur wissenschaftlichen Arbeit hingeführt hat und damit den Grundstock für die weiteren Projekte gelegt hat.

Meinem Freund und Begleiter vom ersten Tag im Herzzentrum, Herrn PD. Dr. Kristof Graf, möchte ich besonders danken, da er durch seine ausgleichende und aufmunternde Art geholfen hat die vielen Tiefpunkte und Rückschläge zu überwinden und die Erfolge zu genießen. Für die vielen anregende Diskussionen am Anfang der Arbeit im Herzzentrum danke ich Herrn PD. Dr. Wolfgang Auch-Schwelk.

Herrn Prof. Roland Hetzer und seinen Mitarbeitern bin ich zu Dank verpflichtet, da sie es mir ermöglichten, aus den explantierten Herzen Teile der Koronararterien und des Herzmuskels zu präparieren. Ohne diese enge und fruchtbare Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Chef und Lehrer Herrn Prof. Dr. Eckart Fleck, der meine wissenschaftliche Arbeit inspirierte und leitete. Seine zahlreichen inhaltlichen Hinweise, die kritischen und fruchtbaren Diskussionen sowie die kontinuierliche und konsequente Unterstützung haben diese Arbeit möglich werden lassen